HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN PLASMAPROTEINE UND DEREN EINSATZ BEI DER REINDARSTELLUNG DES ANTIHÄMOPHILEN UND DES VON WILLEBRAND FAKTORS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
— Dr. rer. nat. —

dem Fachbereich Biologie der
Universität Oldenburg
vorgelegt

von
Thekla Burlager
aus
Esterwegen

1988

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546312_0005

HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN PLASMAPROTEINE UND DEREN EINSATZ BEI DER REINDARSTELLUNG DES ANTIHÄMOPHILEN UND DES VON WILLEBRAND FAKTORS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
— Dr. rer. nat. —

dem Fachbereich Biologie der
Universität Oldenburg
vorgelegt

von
Thekla Burlager
aus
Esterwegen

1988

Referent : Prof. Dr. R. Megnet
Korreferent : Prof. Dr. H. U. Schairer

eingereicht am : 19.02.1988
Mündliche Prüfung am : 20.04.1988

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
	Abkürzungen	
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	9
2.2	Zellinien und Tiere	11
2.3	Proteinbestimmung	12
2.3.1	Proteinbestimmung (Lowry 1951)	12
2.3.2	Proteinbestimmung (Bradford 1976)	12
2.3.3	Proteinbestimmung mit Fluram	13
2.3.4	Quantitative Aminosäureanalyse	13
2.4	Gelelektrophoretische Untersuchungen	14
2.4.1	SDS-Gelelektrophorese (Laemmli 1970)	14
2.4.2	SDS-Porengradienten-PAGE	16
2.4.3	Coomassie-Färbung	18
2.4.4	Silbernitratfärbung	18
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.5	Bestimmung biologischer Aktivitäten	20
2.5.1	FVIII Aktivierung mit Thrombin	20
2.5.2	Bestimmung der FVIII Gerinnungsaktivität	20
2.5.3	Thrombozytenaggregation	24
2.6	Anreicherung des FVIII-Komplexes	26
2.6.1	Proteinfällung mit PEG 6000 und Brij 35	26
2.6.2	Gelfiltration	26
2.6.3	Ionenaustauscherchromatographie mit Trisacryl-M-DEAE	28
2.6.4	Ionenaustauscherchromatographie mit QAE-Cellulose	29
2.6.5	Chromatographie mit Galactosamin-Agarose und Arginin-Sepharose 4B	29

2.7	Spaltung des FVIII-Komplexes und Anreicherung von FVIII:C	30
2.7.1	Spaltung des FVIII-Komplexes	30
2.7.2	Immunaffinitätschromatographie und Spaltung des FVIII-Komplexes	31
2.7.3	Chromatographie an AH-Sepharose	32
2.7.4	Hydrophobe Chromatographie	32
2.8	Aminosäuresequenzierung	33
2.9	Allgemeine Zellkulturtechniken	36
2.9.1	Medienbereitung	36
2.9.2	Kulturbedingungen für Myelomzellen	36
2.9.3	Zellzahlbestimmung	37
2.9.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
2.10	Herstellung monoklonaler Antikörper	38
2.10.1	In-vivo Immunisierung	38
2.10.2	Bestimmung des Antikörpertiters im Serum immunisierter Mäuse	39
2.10.3	In-vitro Immunisierung	40
2.10.4	Milzzellpräparation	41
2.10.5	Zellfusion	42
2.10.6	Kultivierung der Hybridzellen	43
2.10.7	Klonierung durch Einzelzellverdünnung	45
2.10.8	Klonierung in Weich-Agar	46
2.10.9	Klonierung in Methylzellulose	47
2.10.10	Massenzellkultur klonierter Hybridzellen	49
2.11	Immunologische Methoden zum Nachweis von Antikörper oder Antigen	50
2.11.1	ELISA zum Nachweis von Maus-Immunglobulinen	50
2.11.2	ELISA zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper	51
2.11.3	ELISA zur quantitativen Antikörperbestimmung	52
2.11.4	ELISA zur Bestimmung der Antikörpersubklassen	57

2.11.5 Immunblottechnik 58
2.11.5.1 Elektrophoretische Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose 58
2.11.5.2 Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose durch Diffusion 59
2.11.5.3 Immunfärbung von immobilisierten Proteinen 59
2.11.6 Immunfluoreszenzmikroskopie mit adhärenten Zellen 61
2.11.7 Immunfluoreszenzmikroskopie mit Thrombozyten 62
2.11.8 Immunfällung mit ^{125}J-markierten Proteinen 62
2.11.9 Doppeldiffusionstest (Ouchterlony 1948) 64
2.11.10 Radiale Immundiffusion (Mancini 1965) 65
2.11.11 Raketen-Immunelektrophorese 66

2.12 Isolierung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberstand 67
2.12.1 Ammoniumsulfatfällung 67
2.12.2 Capronsäurefällung 68
2.12.3 Chromatographie an Hydroxylapatit 68
2.12.4 DEAE-Ionenaustauscherchromatographie 69
2.12.5 Protein-A-Affinitätschromatographie 69

2.13 Darstellung von Immunaffinitätssäulen 70
2.13.1 Antikörperkopplung an CNBr-aktivierte Sepharose 70
2.13.2 Antikörperkopplung an Aminohexyl-substituierten Säulenmaterialien mittels Carbodiimid 71

3. ERGEBNISSE 72

3.1 Gelelektrophoretische und immunchemische Untersuchungen mit kommerziellen FVIII-Präparaten 72

3.2 Anreicherung des FVIII-Komplexes aus kommerziellen FVIII-Präparaten 77
3.2.1 Proteinfällungen mit PEG 6000 und Brij 35 77
3.2.2 Chromatographie mit Galactosamin-Agarose und Arginin-Sepharose 4B 78
3.2.3 Ionenaustauscherchromatographie 80
3.2.4 Gelfiltration 83

3.2.5	Anreicherung des FVIII-Komplexes durch Chromatographie an Sepharose CL 6B und Trisacryl-M-DEAE	88
3.3	Spaltung des FVIII-Komplexes	89
3.4	Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Bestandteile von FVIII-Präparaten	90
3.4.1	Immunisierung und Fusion	90
3.4.2	Klonierung der Hybridome	95
3.4.3	Wachstum und Antikörperproduktion der Hybridklone	97
3.4.4	Isolierung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberständen	99
3.5	Charakterisierung der Antikörper	103
3.5.1	Bestimmung der Antikörperklasse und Subklasse	103
3.5.2	Nachweis der Antigenspezifität durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit adhärenten Zellen und Thrombozyten	104
3.5.3	Nachweis der Antigenspezifität mittels Immunpräzipitation	111
3.5.4	Reaktivität der Antikörper im Immunblot	113
3.5.5	Einfluß der anti-FVIII:vWf Antikörper auf die Ristocetin abhängige Thrombozytenaggregation	115
3.5.6	Zusammenfassung der charakteristischen Eigenschaften der monoklonalen Antikörper	118
3.6	Anreicherung von FVIII:C mittels Immunaffinitätschromatographie	120
3.6.1	Herstellung der Immunaffinitätssäule	
3.6.2	Anreicherung von FVIII:C aus humanem Plasma	121
3.7	Aminosäuresequenzierung	126

4.	DISKUSSION	128
4.1	Isolierung des FVIII-Komplexes aus kommerziellen FVIII-Präparaten	128
4.2	Herstellung monoklonaler Antikörper	131
4.3	Isolierung von FVIII:C aus humanem Plasma	136
4.4	Weiterführende Arbeiten	142
5.	ZUSAMMENFASSUNG	144
6.	LITERATURVERZEICHNIS	146

Abkürzungen:

Ac	Acetat
APS	Ammoniumpersulfat
AH	Aminohexyl
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CM	Carboxymethyl
cpm	Zählereignisse pro Minute
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
ELISA	Enzym gekoppelter Immunbindungstest (enzym linked immunosorbent assay)
ESG	Hybridoma Wachstumsfaktor von Ewing Sarcoma Zellinie ES1
FAC	Freund's Adjuvans complete
FAI	Freund's Adjuvans incomplete
FCS	Foetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAM	Ziegenantikörper, die gegen Maus-Immunglobuline gerichtet sind
GAR	Ziegenantikörper, die gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet sind
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
ECS	Überstand von kultivierten Endothelialzellen
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosporibosyl-Transferase
HMW	Molekulargewichtsmarkerproteine (High Molekuar Weight)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSA	Humanes Serum Albumin
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
LMW	Molekulargewichtsmarker (Low Molekular Weight)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAPMSF	p-Aminophenylmethylsulfonylfluorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Phenylthiohydantoin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Sulfinpyrazon
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumenanteil
(v/w)	Gewichtsanteil

UNIV. LEIDEN

1. EINLEITUNG

Die Integrität des Blutgefäßsystems ist für jeden Organismus lebensnotwendig. Bei einer Verletzung der Gefäßwand ist der Organismus durch drei verschiedene Mechanismen gegen Blutverlust geschützt:

1. Spontane Kontraktion und Invagination der Gefäßwand am Verletzungsort
2. Adhäsion und Verklumpung von Thrombozyten am geschädigten Gefäßendothel
3. Plasmatische Gerinnung

Die beiden ersten Mechanismen gewährleisten eine wirksame mechanische Blutstillung ("primäre Hämostase").
An den Bindegewebsfasern der Wundränder bleiben Blutplättchen haften. Dieser Kontakt führt zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit der Plättchenmembran. Einige der von den aktivierten Thrombozyten freigesetzten Substanzen wirken vasokonstriktorisch, andere sind für die plasmatische Blutgerinnung notwendig.

Da die Gefahr erneuter Blutung durch Herausspülen des Thrombozytenpfropfes besteht, setzt gleichzeitig die "sekundäre Hämostase", die eigentliche Blutgerinnung ein. Eine Reihe verschiedener Plasmaglykoproteine sind an diesem komplexen enzymatisch gesteuerten Vorgang (Gerinnungskaskade) beteiligt, der letztlich zur Ausbildung eines Blutgerinnsels führt.
Durch das Zusammenspiel von gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Mechanismen wird eine unerwünschte und übermäßige Thromboisierung ebenso verhindert wie eine exsessive Blutung.

Die plasmatische Gerinnung kann durch das intrinsische System an negativ geladenen Oberflächen (wie das Kollagen des subendothelialen Bindegewebes, "Kontaktaktivierung") oder durch das extrinsische System mit Hilfe des Gewebefaktors (Thromboplastin, TTP aus verletzten Gewebszellen) in Gang gesetzt werden. Beide Wege führen zur Aktivierung des Faktor X (siehe Abb.1). Das anschließend entstehende Thrombin spaltet das lösliche dimere Fibrinogen. Unter dem Einfluß von Faktor XIII, dem sogenannten fibrinstabilisierenden Faktor, polymerisieren die Fibrinmonomere zum eigentlichen Endprodukt der Blutgerinnung, dem quervernetzten Fibrin.

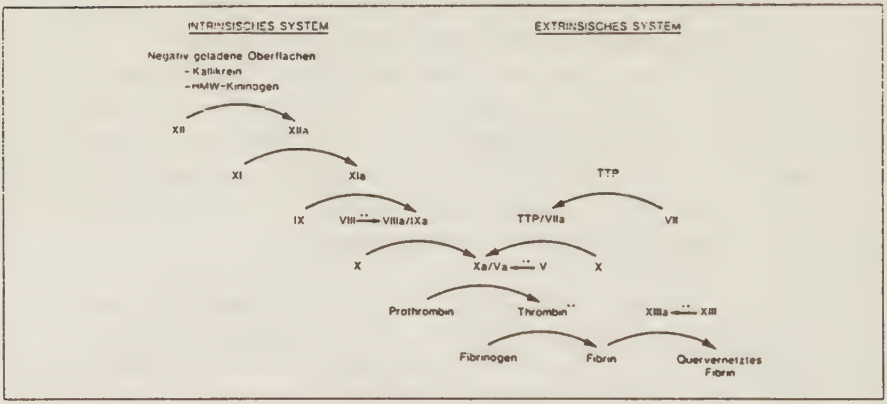


Abb. 1: Blutgerinnungskaskade
** -durch Modifikation der Kofaktoren VIII, V und dem Faktor XIII unterhält und beschleunigt Thrombin den Gerinnungsvorgang
nach Delvos und Müller-Berghaus (1985)

Die Gerinnungsfaktoren können, mit Ausnahme von Fibrinogen und Faktor XIII, in Kofaktoren und Proenzyme vom Typ der Serinproteasen unterteilt werden.

Die Proenzyme werden durch hochspezifische proteolytische Spaltung einer Arg-X-Bindung aktiviert. Die Kofaktoren (V, VIII, HMW-Kininogen) der Gerinnungskaskade beschleunigen nach ihrer proteolytischen Modifikation (z.B. durch Thrombin) massiv die Aktion der Serinproteasen über bisher noch nicht vollständig geklärte Mechanismen (Hultin 1982, Delvos und Müller-Berghaus 1985).
Für den Ablauf der meisten Reaktionen in der Gerinnungskaskade sind Calcium-Ionen und Phospholipide notwendig. Die intrinsiche Aktivierung des Faktor X erfolgt an Phospholipid-Oberflächen z.B. an Membranen von Blutplättchen (siehe Abb.2). Der modifizierte Kofaktor VIII:C vermittelt die Aktivierung des Faktor X durch den bereits aktivierten Faktor IX (Mertens et al. 1985, Hultin 1978).

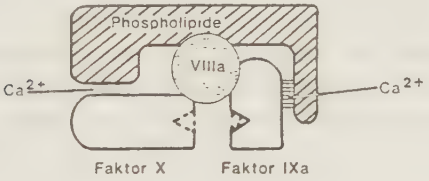


Abb. 2: Die intrinsische Aktivierung des Faktor X nach Delvos und Müller-Berghaus (1985)

Der Faktor VIII Komplex besteht aus zwei ihrer Größe und Funktion nach sehr unterschiedlichen Proteinen, dem Faktor VIII:vWF (vWF= von-Willebrand-Faktor) und dem Faktor VIII:C (C= Coagulation).
Während Faktor VIII:C, der etwa 1 % der Gesamtmenge an FVIII ausmacht, direkt am Ablauf der Gerinnungskaskade (siehe Abb.1) beteiligt ist, vermittelt Faktor VIII:vWf die Adhäsion von Blutplättchen an das freigelegte subendotheliale Kollagen (Kessler et al. 1984, Santoro 1983,

Aihaira et al. 1984, Sixma et al. 1984). Dabei bindet das Protein sowohl an das Glykoprotein Ib auf der Thrombozytenmembran, als auch an das Kollagen des Bindegewebes und dient somit als Mediator der Plättchenadhäsion (Sie et al. 1980, Handa et al. 1986, Sakariassen et al. 1984). Überdies scheint der Faktor VIII:vWf zur Stabilisation des FVIII:C nötig zu sein (Weiss et al. 1977).
Faktor VIII:vWf liegt im Plasma als heterogene Serie von Oligomeren (0,5 - ca. 20 Mio D) vor, die sich aus Untereinheiten von ca. 230 000 D zusammensetzten. Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen geht hervor, daß die aus Protomeren von 100 nm aufgebauten Moleküle eine Länge von 1300 nm erreichen können und zu ca. 13 % in ausgestreckter Form vorliegen (Slayter et al. 1985).

Faktor VIII:vWf und Faktor VIII:C unterliegen unterschiedlicher genetischer Kontrolle und werden in verschiedenen Zelltypen synthetisiert. FVIII:vWf konnte in Endothelialzellen, Thrombozyten und Megakaryozyten nachgewiesen werden (Piovella et al. 1978, Tuddenham et al. 1981, Cramer et al. 1985, Little et al. 1986).
FVIII:vWf wird in Endothelialzellen synthetisiert und in sogenannten "Weibel-Palade-Körperchen" gelagert (Jaffe et al. 1974, Tuddenham et al. 1981, Wagner et al. 1982, Reinders et al. 1984, Sporn et al. 1986).
Diese Endothelialzell-spezifischen Organellen (Weibel und Palade 1964) haben eine Länge von 2 µm und stammen vermutlich vom Golgi-Apparat ab (Matsuda und Sugiura 1970, Sengel und Stoebner 1970).
Die Freisetzung des FVIII:vWf erfolgt durch Exocytose (Warhal et al. 1984, McArthur et al. 1986) und kann durch Thrombin, Phorbolacetat, Calcium Ionophore A23187 und DDAVP(1-deamino-8-D-Arginin Vasopressin) induziert werden (Ruggeri et al. 1982, Levine et al. 1982, Loesberg et al. 1983, McCarrol et al. 1984).

Faktor VIII:C konnte weder in Endothelialzellen von Arterien, Venen und Kapillaren aus Haut, Fettgewebe und Hirn, noch in Thrombozyten nachgewiesen werden. Als Syntheseorte wurden Milz, Niere, Leber und Lymphknoten beschrieben (Doods 1969, Wion et al. 1985, Stel et al. 1986, Toole et al. 1984, Gitschier et al. 1984).
Untersuchungen an Leberschnitten deuten auf eine Synthese in sinusoidalen Endothelialzellen und/oder sinusoidalen Hepatozyten hin (Stel et al. 1983, Zelechowska et al. 1985).
Ein Mangel an biologisch aktivem FVIII:vWf oder FVIII:C führt zu schweren Gerinnungsstörungen. Das Fehlen von FVIII:vWf, vor allem der größeren Multimere, führt durch eine verminderte Plättchenadhäsion zu verlängerten Blutungszeiten (Zimmermann et al. 1983, Ruggeri und Zimmermann 1980). Bei dieser angeborenen von Willebrand-Jürgens-Krankheit ist der FVIII:C Gehalt ebenfalls verringert.
Die klassische Hämophilie A, deren Erbgang X-chromosomal erfolgt, ist durch Mangel oder Anomalie des Faktor VIII:C bedingt (Zimmermann et al. 1971, Rock et al. 1981, Mertens et al. 1985). Bei dieser Erkrankung ist die FVIII:C Aktivität verringert, während die Funktion des FVIII:vWf intakt ist (Zimmermann und Fulcher 1985). Der Schweregrad der Erkrankung ist abhängig von der verbliebenen Restaktivität des Gerinnungsfaktors. Das typische Erscheinungsbild mit spontanen Einblutungen in präformierte Körperhöhlen (z.B. Gelenke und Nierenbecken), oder infolge geringer Verletzungen auftretenden starken Blutungen, findet sich fast ausschließlich bei schweren bzw. mittelschweren Hämophilien, die eine Gerinnungsaktivität von 0-3 % der Norm aufweisen. Bei Gesunden schwankt die Gerinnungsaktivität zwischen 70 und 300 %.
Die Hämophilie A, die durchschnittlich bei einem von 5000 Männern auftritt (Rizza 1972), wurde bis zum

Erscheinen der FVIII-Konzentrate, mit Frischblut- bzw. Plasmatransfusion behandelt. Die Kosten für die Herstellung der FVIII-Konzentrate sind allerdings sehr hoch und eine ausreichende Versorgung ist in vielen Ländern, vornehmlich der Dritten Welt, gegenwärtig noch nicht gewährleistet.
Die Hämophilen müssen den fehlenden Gerinnungsfaktor ihr Leben lang ersetzten. Die Höhe der Dosierung hängt sowohl vom Körpergewicht, als auch von Schwere und Ort der Blutung ab. Die Gabe von einer Einheit FVIII (dies entspricht der Gerinnungsaktivität in einem ml standardisiertem Plasma) pro kg Körpergewicht erhöht die Gerinnungsaktivität im Blut um ca. 1 % des Normalwertes. Die biologische Halbwertzeit von FVIII:C nach der Transfusion beträgt 8-12 Stunden (Zimmermann und Fulcher 1985). Bei einer prophylaktischen Behandlung eines Hämophilie-Patienten werden bis zu 200 000 Einheiten pro Jahr verabreicht.
Die Risiken der FVIII-Substitutionstherapie zeigten sich als mehrere Patienten an Hepatitis und AIDS erkrankten (Chediak et al. 1984, Gerstoft et al. 1984, Ragni et al. 1986). Um die Übertragung humanpathogener Viren zu verhindern wurde kürzlich die Pasteurisierung von FVIII-Konzentraten eingeführt. Dies scheint eine geeignete Methode zur Virusinaktivierung zu sein ohne die Effektivität des Präparats zu beeinflussen (Hilfenhaus und Weidmann 1986, Margolis und Li 1986).

Die im Handel erhältlichen FVIII-Therapeutika werden in "intermediat purity"- (ca. 1E/mg Protein) und "high purity"- FVIII-Konzentrate (ca. 3 - 10 E/mg) eingeteilt (Ng et al. 1986, Thorell et al. 1983). Hierbei handelt es sich um teilweise angereicherte FVIII-Präparationen, die noch starke Verunreinigungen durch andere Plasmaproteine aufweisen, und deren Proteinzusammensetzung je nach Hersteller und von Charge zu Charge sehr stark variiert (Miyashita et al. 1984, Morfini et al. 1984).

Starke Diskrepanz zeigt sich auch bei der angegeben und tatsächlich gemessenen FVIII:C-Aktivität der kommerziellen Präparate (Austen et al. 1981, Kröninger et al. 1982, Rock et al. 1985).

Um das Risiko einer falschen Dosierung und Nebenwirkungen durch die hohe Konzentration an kontaminierenden Proteinen zu vermindern, ist die Entwicklung eines hochgereinigten, standardisierten FVIII-Präparats notwendig.

Trotz der großen Bedeutung von FVIII:C bei der Blutgerinnung war bis vor kurzem nur wenig über die Struktur und Wirkungsweise des Proteins bekannt, da nur unter größten Schwierigkeiten winzige Mengen des Materials rein dargestellt werden konnten. Die Ursache der Schwierigkeit lag in der niedrigen Plasmakonzentration (50-150 ng/ml bei ca. 70 mg/ml Gesamtprotein, Marder et al. 1985) und der extremen Empfindlichkeit gegen Proteolyse (Rick et al. 1985).
Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Isolierung und Charakterisierung des Gerinnungsproteins geleistet werden. Dabei wird folgende Strategie eingesetzt:

1) Anreicherung des FVIII-Komplexes aus käuflichen Präparaten mit Hilfe kommerzieller Säulenmaterialien
2) Immunisierung von Mäusen mit angereichertem FVIII und Herstellung monoklonaler Antikörper
3) Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode zur Detektion der Antikörper,die gegen FVIII:vWf gerichtet sind
4) Massenzellkultur und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus Zellkulturüberständen
5) Kopplung der Antikörper an geeignete Säulenmaterialien
6) Adsorption des FVIII-Komplexes, Spaltung des Komplexes und Isolierung von FVIII:C

Etwa zwei Jahre nach Beginn der vorliegenden Arbeit wurden die ersten Berichte über eine erfolgreiche Klonierung und Expression von FVIII:C veröffentlicht (Genentech: Vehar et al., Gitschier et al., Wood et al. 1984; Genetic Instituts: Toole et al. 1984).
Die gelungene Expression von FVIII:C in Säugetierzellen läßt hoffen, daß längerfristig neben dem aus Plasma isolierten FVIII ein gentechnologisches Produkt für die Therapie der Bluterkrankheit eingesetzt werden kann. Da zunächst eine Vielzahl klinischer Tests erforderlich sind, um die in-vivo Effektivität und Sicherheit des Produkts zu klären, dürften allerdings noch einige Jahre vergehen, bis rekombinanter FVIII:C im großen Maßstab produziert und auf dem Markt angeboten werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Amersham Buchler	: $Na^{125}J$
Baker	: Methanol
Behring AG	: Antiseren gegen FVIII:vWf (Clotimmun), Fibrinogen und Fibronectin
Biochrom	: Gentamycin
Bio Rad	: Agar, Biogel A 1,5 m, "Solid Phase Lactoperoxidase-Glucose Oxidase System for Radioiodination"
BLB	: Erosa Injektionskanülen Luer Konus, Skalpell
Boehringer	: BSA, Glutamin, Penicillin/ Streptomycin, HAT-Konzentrat 50x, HT-Konzentrat 50x, PEG 1500
BRL	: Agarose Ultrapure
Calbiochem	: pAPMSF
Costar Biologicals	: ESG (Hybridomwachstumsfaktor) HECS (Überstand von humanen Endothelialzellen)
Difco	: Zellkulturmedien, F 12, IMDM, DMEM, RPMI 1640
DRK-Blutspendedienst Nordrheinwestfalen Lippe	: Antihämophiles Globulin A human, 1000 E
DRK-Blutspendedienst Springe	: Thrombozytenkonzentrat human

Falcon	: Zellkulturflaschen 500 ml
Fluka	: PMSF, Ethanolamin
Glowex	: sterile Handschuhe
Greiner	: Petrischalen für die Zellkultur, Zellkulturflaschen (50, 250 ml), Gerinnungsröhrchen
Gibco	: FCS, Natriumpyruvat, Vitamine MEM- nicht essentielle Aminosäuren
Henke-Sass, Wolf GmbH	: Einmalspritzen
Limbro	: Zellkulturplatten 24-Loch
LKB	: ACA 22, Trisacryl-M-DEAE
Merz + Dade	: FVIII-Mangelplasma, Actin, Coag Cal N, Coag Trol P
Medac, Tago Inc.	: Antihämophiler Faktor (human) 1000 E, Ziege anti Maus Antikörper
Merck	: alle nicht im einzelnen aufgeführten Chemikalien
Millipore	: Sterilfilter 0,22 µm,
Nunc	: Einfrierröhrchen, Mikrotiterplatten, Immunoplatten, 50 ml Zentrifugenröhrchen
Pharmacia	: Eichproteine HMW und LMW, SP-Sephadex, Sepharosen: 2B, CL 4B und CL 6B, Sephacryl S-300 und 400, PD 10-Säule
Rhone-Poulenc Pharma Institut Bio Merieux	: Actif VIII, 500 E

Serva	: Acrylamid, APS, N,N'-Methylenbisacrylamid, CNBr, PEG 6000, HEPES, SDS, 2-Mercaptoethanol TMED, Fluram, Triton X-100, Coomassie Brilliant Blue R250
Sigma	: MOPS, Imidazol, MES, Tris, DTT, Monothioglycerol, FAF-BSA, Gelatine G 2500, Maus-IgG
Schleicher und Schüll	: Nitrozellulosefilter, Faltenfilter
Whatmann	: Filterpapier
Zymed	: Ziege anti-Kaninchen Antikörper, MonoAb-ID EIA Kid (Test-Set zur Bestimmung von Antikörpersubklassen)

2.2 Zellinien und Tiere

Myelomzellinie	abgeleitet von	Ig	Herkunft
Ag8 (X-63-Ag8.6.5.3)	X63-Ag8	keine	Brüggen
NSI (NSI-Ag4/1)	X63	kappa, intrazellulär	Schairer
NSO	Balb/c	keine	Schairer

Alle Myelomzellinien stammen aus Balb/c Mäusen. Für die Produktion von antikörpersezernierenden Hybridzellen werden die Ausgangsmyelomzellinien auf Verlust der Ig-Synthese und des Enzyms HPGRT kloniert (Köhler und Milstein 1976, Kearney et al. 1979).

Endothelialzellen	: wurden von Dr. Czapla aus humanen Nabelschnüren isoliert
Fibroblasten(human)	: FS4
Mausfibroblasten	: Balb/c, Swiss 3T3, AKR 431 (American Type Culture Collection)
Mäuse	: Balb/c, Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover

2.3 Proteinbestimmung

2.3.1 Proteinbestimmung (Lowry 1951)

Die Proteinlösung wird in 1 ml Natriumdesoxycholat aufgenommen und mit 10% (v/v) TCA ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 8000xg wird das Sediment in 120 µl 20 mM SDS aufgenommen und mit 1 ml einer frisch angesetzten Lösung aus 2 % (w/v) Na_2CO_3, 0,1 M NaOH, 0,02 % (w/v) K-tartrat und 0,01 % (w/v) $CuSO_4$ bei 37 °C 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 50 % (v/v) Folinreagenz wird 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion der Lösung wird bei der Wellenlänge von 650 nm gegen den Nullwert (Reagenzien ohne Protein) gemessen. Die Eichreihe wird mit BSA erstellt.

2.3.2 Proteinbestimmung (Bradford 1976)

Färbelösung: 0,06 % (w/v) Coomassie G-250
1,90 % (v/v) Perchlorsäure
98,04 % (v/v) H_2O-dest.

In die Löcher einer Mikrotiterplatte (442404, Nunc) werden je 100 µl H_2O-dest. pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl Proteinlösung und 100 µl Färbelösung pro Mikrotiterloch, erfolgt eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Die Extinktion wird bei der Wellenlänge von 630 nm gegen die Referenzwellenlänge von 405 nm mit dem Mikroelisa Auto Reader (MR 580,Dynatech) gemessen. Die Eichreihe wird mit BSA erstellt.

2.3.3 Proteinbestimmung mit Fluram

Lösungen: 1. 0,20 M Na-Borat pH 9,0
2. 0,03 % (w/v) Fluram (in Aceton gelöst)

Durch Zugabe von 100 µl 50 % (v/v) TCA pro ml wird das Protein in den Proben bzw. BSA Lösungen (1-100 µg/ml) ausgefällt. Nach der Zentrifugation wird das Sediment in 1,5 ml Lösung 1 aufgenommen, 0,5 ml Lösung 2 hinzupipettiert und möglichst schnell gemischt (Vortex-Mixer). Mit der Nullprobe (Ansatz ohne Protein) wird das Fluorimeter (SPF 500, Aminco, Anregung 390 nm, Ausstrahlung 475 nm) auf 0 geeicht und die Fluoreszenz der Standard- bzw. Probeansätze bestimmt. Die Glasküvetten werden vor Gebrauch mit Salpetersäure gesäubert, mit H_2O-dest. und Ethanol gewaschen und getrocknet.

2.3.4 Quantitative Aminosäureanalyse

Der Proteingehalt von Proben mit geringer Proteinkonzentration (1-10 µg) wird mit Hilfe der Aminosäureanalyse bestimmt.
Nach dem Eintrocknen der Probe (Speed Vac.,Savant) wird das Sediment in 200 µl 6 N HCl aufgenommen und über Nacht bei 110 °C hydrolysiert. Die Probe wird eingetrocknet und in 200 µl des nachfolgenden Puffers aufgenommen und in den Probensammler des Aminosäureanalysators (LC 2000, Biotronik) eingespritzt.

Probenverdünnungspuffer(pH 2,2):

tri-Natriumcitrat x 2 H_2O	19,6 g
Salzsäure 37 %	14,0 ml
Phenol	2,0 g
Thiodiethanol	20,0 ml

in 1 l H_2O lösen

Der Aminosäureanalysator arbeitet vollautomatisch. Ein angeschlossener Rechner gibt die Retentionszeiten und die Integrale der einzelnen Peaks an, die von einem Schreiber aufgezeichnet werden. Die Säule wird vor der Analyse mit Aminosäurestandards geeicht.

2.4 Gelelektrophoretische Untersuchungen

2.4.1 SDS-Gelelektrophorese (Laemmli 1970)

Lösungen:

A: 40 % (w/v) Acrylamid
1 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

B: Lower Tris
1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,4 % (w/v) SDS

C: Upper Tris
0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

D: Elektrophoresepuffer
25 mM Tris-HCl pH 8,6
192 mM Glycin
0,15 % (w/v) SDS

E: Probenpuffer

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8
17,4 % (v/v) Glycerin
2 % (w/v) SDS
2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Tab. 1: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

	Sammelgel	Trenngel	
Acrylamid	3 %	6 %	10 %
Lösung A ml	0,6	4,5	7,5
B ml	-	7,5	7,5
C ml	1,9	-	-
Glycerin ml	-	5	5
H_2O ml	5	13	10
TMED µl	9	20	24
APS 40% µl	18	30	36

Elekrophoresesysteme:
1. Vertical Gel Elektrophoresis System Modell V16 (BRL)
2. Mighty Small II Slab Gel Elektrophorese Unit SE 250 (Hoefer Scientific Instruments)

Das Sammelgel wird direkt auf das Trenngel geschichtet, bevor dieses polymerisiert ist. Die Proteinproben werden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker werden Standardproteingemische (HMW, LMW, Pharmacia) aufgetragen.

Nach dem Auftragen der Proben (max. 20 µl) wird eine Spannung von 150 V angelegt, die nach dem Einwandern der Proteine ins Trenngel auf 300 V erhöht wird. Das Gel wird mit Hilfe eines Ventilators gekühlt. Die Elektrophoresedauer beträgt beim Elektrophoresesystem 1 ca. 3 Stunden und beim Elektrophoresesystem 2 ca. 1 Stunde. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel mit Coomassie Brilliant Blue (2.4.3) bzw. Silbernitrat (2.4.4) gefärbt, oder direkt für den Immunblot (2.13.5) verwendet.

2.4.2 SDS-Porengradienten-PAGE

Neben Gelen mit konstanter Acrylamidkonzentration im Trenngel können Gradientengele gegossen werden. Dazu werden zwei miteinander verbundene Gradientenmischkammern benötigt (Abb.3).

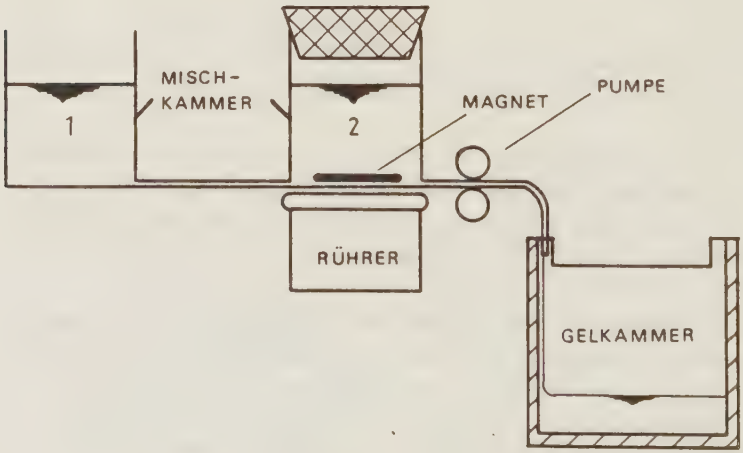


Abb. 3: Schema zur Herstellung von Gradientengelen

Tab. 2: Zusammensetzung eines Gradientengeles (6-16%)

	Kammer 1	Kammer 2
Lower Tris (siehe 2.4.1)	6,5	2,5 ml
22,2% (w/v) Acrylamid 1,0% (w/v) Diallylweinsäurediamid	7,0	- ml
30,0% (w/v) Acrylamid 1,5% (w/v) Diallylweinsäurediamid 15,0% (w/v) Sucrose	-	5,3 ml
H_2O-dest.	12,5	2,2 ml
40,0% (w/v) Ammoniumpersulfat	15	8 µl
TMED	20	5 µl

Die obigen Lösungen werden in Kammer 1 und 2 gegeben. Die Kammer 2 wird geschlossen. Die Lösung aus Kammer 1 wird in Kammer 2 gepumpt, in der die Lösungen durch Rühren gemischt werden. Aus Kammer 2 wird das Gemisch durch eine Kapillare zwischen die Glasplatten der Elektrophoresekammer geleitet. Das Gradientengel wird zum Abschluß mit H_2O überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird das Sammelgel (3%ig,siehe 2.4.1) gegossen.

2.4.3 Coomassie-Färbung

Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassie Blau R 250 (Serva)
in Entfärber

Entfärber : 45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
45% (v/v) H_2O-dest.

Das Gel wird 30 min in der Färbelösung auf einem Schüttler (Rocker-Platform, Belco Glass) inkubiert. Danach wird das Gel unter mehrmaligem Wechsel des Entfärbers solange geschwenkt, bis nur noch die Proteinbanden blau angefärbt sind. Die Gele werden mit einer Polaroidkamera photographiert (Polaroidfilm Typ 665,Gelbfilter, Durchlicht, Blende 11, Belichtungszeit 1/4 sec).

2.4.4 Silbernitratfärbung (verändert nach Oakley 1980)

Das Gel wird nach der Elektrophorese in eine Glasschale gelegt und nacheinander in folgenden wässrigen Lösungen geschüttelt:

1)	50 % (v/v) Methanol	mindestens	30 min
	10 % (v/v) Essigsäure		15 min
2)	50 % (v/v) Methanol		15 min
	12 % (w/v) TCA		
	2 % (w/v) $CuCl_2$		
	1 % (w/v) $ZnCl_2$		
3)	10 % (v/v) Isopropanol		15 min
	5 % (v/v) Essigsäure		
4)	0,01% (w/v) $KMnO_4$		15 min

5)	10 % (v/v)	Isopropanol	10 min
	5 % (v/v)	Essigsäure	
6)		H_2O-dest.	10 min
7)		H_2O-dest.	10 min
8)	0,1 % (w/v)	$AgNO_3$	10 min

Das Gel wird kurz mit H_2O-dest. gespült und mit

2 % (w/v) Na_2CO_3
0,1 % (v/v) Formaldehyd

solange entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar werden (2-5 min). Gestoppt wird mit 1 % (v/v) Essigsäure. Das Gel wird kurz gewässert, auf Filterpapier (Schleicher und Schüll) gelegt und getrocknet (Geltrockner 224, Bio Rad).

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Laufpuffer: 40 mM Tris-Acetat pH 7,5
20 mM Na-Acetat
1 mM EDTA
Gel : 1 % (w/v) Agarose in Laufpuffer

Die Agarose wird in Laufpuffer aufgekocht und 50 ml dieser Lösung in eine BRL-Horizontalgelform gegossen. Die Proben werden in Laufpuffer mit 10 % (v/v) Glycerin und 0,02 % (w/v) Bromphenolblau gelöst.
Die Elektrophoresedauer beträgt bei 150 V ca. 3-4 Std. Das Gel wird mit Coomassie gefärbt (2.4.3) oder für den Immunblot (2.13.5.2) verwendet.

2.5 Bestimmung biologischer Aktivitäten

2.5.1 FVIII Aktivierung mit Thrombin

Vor der Aktivierung mit Thrombin wird die FVIII-Probe so verdünnt, daß sie eine Aktivität von 40 % aufweist. Die Aktivierung wird durch Zugabe von 0,1 E Thrombin pro ml Probe gestartet. Die Probe wird sofort mit isotonischer NaCl-Lösung verdünnt (1:500 und 1:1000). Die Verdünnungen werden vor der Thrombinaktivierung vorbereitet. Nach 0, 2, 5, 10, 30 und 45 min werden jeweils 2 x 100 µl entnommen und 10 µl pAPMSF (Calbiochem) hinzupipettiert. Die Bestimmung der Gerinnungsaktivität erfolgt nach der unter Punkt 2.5.2 beschriebenen Methode.

2.5.2 Bestimmung der FVIII Gerinnungsaktivität

Die FVIII Gerinnungsaktivität wird mit Hilfe eines Coagulometers (Schnitger und Gross) ermittelt. Für die Gerinnungsmessung werden folgende Reagenzien benötigt:

1. FVIII-Mangelplasma:

Die FVIII-Aktivität beträgt weniger als 1 %, bezogen auf einen Normalplasmapool mit einer Aktivität von 100%. FVIII-Mangelplasma liegt in lyophylisierter Form vor.

2. Actin:
Dieses Reagenz dient als Ersatz für Plättchenfaktor 3. Es handelt sich um ein flüssiges, aktiviertes Cephaloplastinreagenz, das aus Kaninchenhirnextrakt hergestellt, und dem ein besonderer Plasmaaktivator und Stabilisatoren zugesetzt wurde.

3. Coag Cal N:
Kalibrierplasma, das aus einem Frischplasmapool von 100 gesunden Spendern hergestellt wurde.

4. Coag Trol P:
Kontrollplasma mit deklarierten Werten

5. Owren's Veronalpuffer pH 7,35

6. 0,025 M $CaCl_2$

Prinzip der Gerinnungsmessung:

Gibt man zu Citratplasma im angemessenen Überschuß Cephaloplastin (Actin) und Calciumionen, so ist unter diesen Bedingungen die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung ein Maß für die Aktivität der Faktoren XII,XI,IX, VIII,X,V,II und I im untersuchten Plasma. Mit Hilfe der partiellen Thromboplastinzeit überprüft man somit die Funktionstüchtigkeit aller endogenen Gerinnungsfaktoren Die FVIII-Aktivität der zu untersuchenden Proben wird am Grad der Korrektur gemessen, der durch Zugabe von FVIII-Mangelplasma erzielt wird (aktivierte Thromboplastinzeit, APTT). Die Gerinnungswerte werden anhand einer mit Normalplasma (Coag Cal N) erstellten Bezugskurve ermittelt. Der Normalplasmapool ergibt eine Korrektur von 100 %. Dies entspricht einer Gerinnungsaktivität von 100 % bzw. 1 E FVIII pro ml Plasma.

Durchführung:

Die Gerinnungsröhrchen (Greiner) und die 0,025 M $CaCl_2$-Lösung werden im Heizblock des Coagulometers auf 37 °C vorgewärmt. Die Reagenzien 1, 3 und 4 werden mit 1 ml H_2O-dest versetzt und in den geschlossenen Flaschen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach bis zur vollständigen Lösung rotiert. Nach Vorgabe von 100 µl Actin und 100 µl Probe, pipettiert man 100 µl FVIII-Mangelplasma in die vorgewärmten Gerinnungsröhrchen. Nach 180 Sekunden wird 100 µl der $CaCl_2$-Lösung hinzupipettiert und zur gleichen Zeit die am Coagulometer vorhandene Uhr gestartet. Bei Eintritt der Gerinnung stoppt die Uhr und die Gerinnungszeit kann abgelesen werden.
Die Eichreihe wird mit Coag Cal N, einem standardisierten Plasma erstellt. Eine geometrische Verdünnungsreihe des Coag Cal N wird mit Owren's Veronalpuffer von 1:5 bis 1:600 hergestellt. Bei jeder der sechs Normalplasma-Verdünnungen wird die APTT (aktivierte Thromboplastinzeit) in Dreifachbestimmung ermittelt. Die Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen werden auf doppeltlogarithmischen Papier aufgetragen: Ordinate= Gerinnungszeit in Sekunden, Abszisse= FVIII-Gerinnungsaktivität (Abb. 4). Die 1:5 Verdünnung des Kalibrierplasmas entspricht 100 % Gerinnungsaktivität. Dementsprechend muß von allen zu testenden FVIII-Proben zuerst eine 1:5 Verdünnung gemacht werden.
Proben mit hoher Aktivität werden von dieser Grundverdünnung ausgehend entsprechend weiter verdünnt.
Proben mit hohen $CaCl_2$-Konzentrationen müssen vor der Messung dialysiert werden. Ist dies auf Grund eines starken Aktivitätsverlustes (z.B. bei niedriger Proteinkonzentation der Probe) nicht möglich, so muß eine Eichreihe erstellt werden, bei der die Kontrollplasma-Verdünnungen die gleiche $CaCl_2$-Konzentration wie die zu messende Probe aufweisen.

Zuerst werden die Verdünnungen des Kontrollplasmas wie bei der normalen Eichreihe (1:5 bis 1:600) hergestellt. Die Proben der Eichkurve werden danach mit Puffer, der die doppelte $CaCl_2$-Konzentration wie die zu messende Probe enthält, im Verhältnis 1:1 verdünnt. Jede Plasmaprobe wird erst kurz vor der Messung verdünnt und sofort gemessen, um eine vorzeitige Gerinnung zu vermeiden. Aus den Meßpunkten ergibt sich eine zur normalen Eichreihe nach unten verschobene Gerade mit den Werten 50 bis 1,6 % Gerinnungsaktivität.

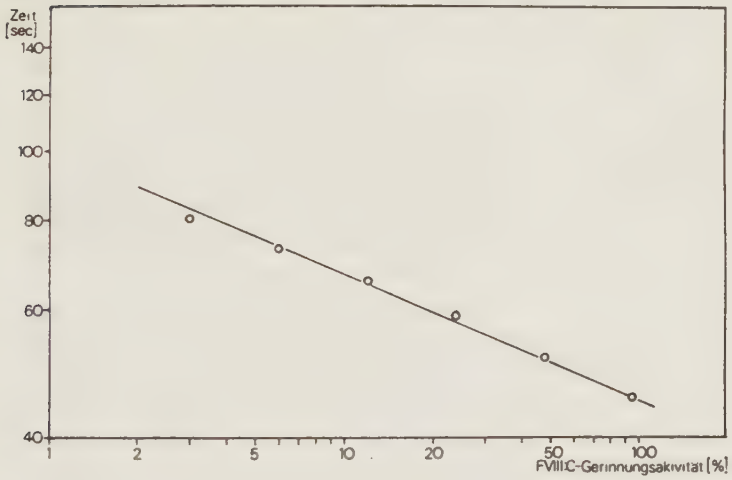


Abb. 4: Eichdiagramm zur FVIII-Gerinnungsmessung

Da der Gerinnungstest sehr störanfällig ist, sind ständige Kontrollen unerläßlich. Der pH-Wert des Verdünnugspuffers muß zwischen 7,0 und 7,5 liegen, da die Steilheit der Eichkurve vom pH-Wert abhängig ist. Alle Lösungen werden mit deionisiertem, filtriertem (Millipore) H_2O angesetzt. Für Verdünnungsreihen sollten nur Plastikröhrchen verwendet und Einzelverdünnungen gemacht werden. Da die Reagenzien nach Rekonstitution nur kurze Zeit haltbar sind, müssen die Messungen zügig durchgeführt werden. Zur Überprüfung der Messungen dient das Kontrollplasma (Coag Trol P). Neue Eichreihen müssen erstellt werden, wenn sich die Charge der Reagenzien ändert.

2.5.3 Thrombozytenaggregation

Die quantitative Bestimmung der Thrombozytenaggregation kann mit Hilfe spezieller Aggregometer durchgeführt werden, die den Aggregationsverlauf photometrisch erfassen (Born 1962, Breddin 1975).
Hierbei wird ein Lichtstrahl durch eine Thrombozytensuspension geschickt und die Änderung der Lichtstreuung nach Induktion der Aggregation durch bestimmte Agentien (z.B. ADP, Thrombin, Ristocetin), photometrisch registriert.
Die Aggregationsmessungen werden im Spektrophotometer (DW-2a^{TM}, Aminco) mit einem unter dem Küvettenhalter eingebauten Rührer (GBF-Werkstatt) bei einer Wellenlänge von 600 nm dürchgeführt und mit Hilfe eines Schreibers kontinuierlich aufgezeichnet. Für die Aggregationsmessungen wird ein 2 Tage altes humanes Thrombozytenkonzentrat (DRK-Blutspendedienst, Springe) eingesetzt. Für die Messungen werden Plastikküvetten verwendet. Das Probevolumen beträgt 2 ml.

Vor der eigentlichen Aggregationsmessung werden die Werte, die 0 % und 100 % Aggregation entsprechen, festgelegt und auf dem Schreiberpapier eingezeichnet.

Der 100 % Aggregationswert:
Plättchenarmes Plasma (PAP) wird durch Zentrifugation (8000xg/15 min) aus Thrombozytenkonzentrat gewonnen. Nach einer 1:4 Verdünnung mit Medium oder PBS (2.13.1) werden zwei Küvetten mit je 2 ml dieser Probe gefüllt und in das Zweistrahlphotometer gestellt. Der gemessene Wert wird auf dem Schreiber registriert und dem 100 % Aggregationswert zugeordnet.

Der 0 % Aggregtionswert:
Humanes Thrombozytenkonzentrat wird mit PAP auf $5x10^8$ Thrombozyten/ml eingestellt. Nach einer 1:4 Verdünnung mit Medium oder PBS werden jeweils 2 ml in die Mess- und in die Referenzküvette pipettiert. Die Thrombozytensuspension wird kontinuierlich gerührt (1000 Upm). Mit einer Schreibergeschwindigkeit von 1,5 cm/min wird der 0 % Aggregationswert aufgezeichnet (ca. 2 min). Danach wird die Aggregation gestartet.

Ausgelöst wird die Aggregation durch Zugabe von 100 µl Ristocetin (Stammlsg.: 15 mg/ml, Sigma) zur Thrombozytensuspension (Messküvette). In die Referenzküvette wird 100 µl Medium oder PBS pipettiert. Der Aggregationsverlauf wird mit Hilfe eines Schreibers kontinuirlich aufgezeichnet.

Die Aggregometrie wird eingesetzt, um den Einfluß monoklonaler anti-FVIII:vWf Antikörper auf die Ristocetinvermittelte Thrombozytenaggregation zu testen. Die Verdünnung der Thrombozytensuspension erfolgt in diesem Fall nicht mit Medium oder PBS, sondern mit Kulturüberstand oder gereinigten Antikörpern (siehe 2.14).

Die Positivkontrolle wird mit polyklonalem Antiserum (Clotimmun, Behring AG, Verdünnung 1:20, 1:40, 1:200) durchgeführt. Der 10 min nach der Ristocetinzugabe erreichte Aggregationswert (%), und der Zeitpunkt an dem 50 % Aggregation eingetreten ist, wird ermittelt. Die erhaltenen Werte werden mit der Kontrolle (ohne Antikörper) verglichen.

2.6 Anreicherung des FVIII-Komplexes

2.6.1 Proteinfällung mit PEG 6000 und Brij 35

Die lyophylisierten FVIII-Präparate werden mit 10 mM Tris-HCl Puffer versetzt (100 mg/ml), 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch vorsichtiges Rotieren in Lösung gebracht. Aliquots des gelösten FVIII-Präparates werden mit 1-10 % (v/v) PEG 6000 bzw. 0,2-10 % (v/v) Brij 35-Lösungen im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die PEG-Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen betragen 0,5, 1,5, 2, 3,5, und 5 % (v/v), die Brij-Konzentrationen betragen 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 0,9, 1 und 5 % (v/v). Die Proben werden 12 Stunden bei 4 °C inkubiert und 15 min bei 8000xg abzentrifugiert. Das Sediment wird in 100 µl 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,4 gelöst. Die FVIII:C-Aktivität und die Proteinkonzentration der Proben wird bestimmt (siehe 2.5.2 und 2.3). Die gefällten Proteine werden im SDS-Polyacrylamidgel (2.4.1) aufgetrennt und mit der Silbernitratfärbung (2.4.4) sichtbar gemacht.

2.6.2 Gelfiltration

Folgende Säulenmaterialien werden auf ihre Eignung für die Anreicherung von FVIII aus kommmerziellen FVIII-Präparaten getestet:

Säulenmaterial	Trennbereich (D)
Sepharose CL 4B (Pharmacia)	7×10^4 - 20 x 10^6
Sepharose CL 6B (Pharmacia)	6×10^4 - 4 x 10^6
Sephacryl S-300 (Pharmacia)	1×10^4 - 1 x 10^6
Sephacryl S-400 (Pharmacia)	2×10^4 - 9 x 10^6
Biogel A 1,5 m (Bio-Rad)	1×10^4 - 1,5 x 10^6
ACA 22 (LKB)	5×10^4 - 22 x 10^6

Elutionspuffer:

1.Citratpuffer pH 7,35
5 mM Na-Citrat
1 mM $CaCl_2$
135 mM NaCl
5 % (w/v) Glucose

2. Barbitalpuffer pH 7,0
17 mM Barbital-Na Salz
125 mM NaCl

3. Barbitalpuffer pH 7,0
+ 3,5 % (w/v) Dextran T40

Den Elutionspuffern wird der Proteinaseinhibitor PMSF (0,5 mM) zugesetzt.

Säulenbett :1,6 x 100 cm Volumen:200 ml
Elutionsgeschwindigkeit:15 ml/h
Fraktionsgröße : 1 ml

Das Säulenmaterial wird mit dem entsprechenden Elutionspuffer versetzt, unter Vakuum entgast und luftblasenfrei in die Säule gegossen. Das Säulenmaterial wird mit einem Liter entgastem Puffer äquilibriert. Das FVIII-Präparat wird in Elutionspuffer aufgenommen (100mg/ml), 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und unter leichtem Schütteln vollständig gelöst. 2 ml der Proteinlösung werden auf das Säulenmaterial aufgetragen. Die Elution erfolgt mit einer Geschwindigkeit von 15 ml/h (Microperpex Peristaltic Pump, LKB). Die Elution der Proteine wird bei 280 nm im Durchflußphotometer (2238 Uvicord SII, LKB) gemessen und auf einem Schreiber (Recorder 2-Channel 2210, LKB) aufgezeichnet. Die Chromatographie wird bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Sepharose CL 6B Gelfiltration

Die Anreicherung größerer FVIII-Mengen wird durch Gelfiltration unter folgenden Bedingungen dürchgeführt:

Säulenmaterial	: Sepharose CL 6B
Säulenbett	: 5 x 97 cm Volumen: 1900 ml
Elutionsmittel	: Citratpuffer pH 7,35
Fraktionsgröße	: 15 ml
Elutionsgeschwindigkeit	: 225 ml/h

2 g des FVIII-Präparates (Actif VIII, Rhone Poulenc Institut Merieux) werden in 20 ml Citratpuffer gelöst, auf das Säulenmaterial aufgetragen und bei einer Pumpgeschwindigkeit von 225 ml/h mit 2,4 l Citratpuffer eluiert. Die Versuchsdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur. Fraktionen mit FVIII-Aktivität werden vereinigt und entweder sofort für weitere Reinigungsschritte (z.B. Ionenaustauscher,2.6.3) verwendet, oder durch eine 40%ige Ammoniumsulfatfällung (siehe 2.14.1) 50fach konzentriert. Das ausgefällte Protein wird in 0,1 M Mops-Puffer pH 7,5 aufgenommen und gegen Mops-Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert, aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Diese angereicherte FVIII-Präparation wird zum Immunisieren der Mäuse (2.12.1), für den ELISA (2.13.2) und für die Immunfällung (2.13.8) verwendet.

2.6.3 Ionenaustauscherchromatographie mit Trisacryl-M-DEAE

Säulenmaterial	: Trisacryl-M-DEAE (LKB)
Säulenbett	: 1,5 x 8,5 cm Volumen: 20 ml
Elutionsmittel	: Stufengradient: 50, 150 und 400 mM NaCl in Imidazol-Puffer(20 mM, pH 7,0)
Elutionsgeschwindigkeit	: 30 ml/h

In 20 mM Imidazol-Puffer gelöste FVIII-Konzentrate (150 mg/5ml) bzw. mittels Gelfiltration angereicherte FVIII-Präparationen werden auf das Säulenmaterial aufgetragen. Die Elution erfolgt stufenweise mit 50, 150, und 400 mM NaCl in Imidazolpuffer. Es werden 1 ml Fraktionen gesammelt.

2.6.4 Ionenaustauscherchromatographie mit QAE-Cellulose

Säulenmaterial:	: QAE-Cellulose
Säulenbett	: 1 x 4 cm Volumen: 3 ml
Elutionsmittel	: Linearer Gradient von 200 bis 500 mM NaCl in 50 mM Imidazol-Puffer pH 7,0 je 15 ml
Elutionsgeschwindigkeit:	15 ml/h
Fraktionsgröße	: 1 ml

Das Säulenmaterial wird mit 50 mM Imidazol-Puffer + 150 mM NaCl pH 7,0 äquilibriert. 50 mg FVIII-Konzentrat wird in 5 ml 50 mM Imidazol-Puffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen des Säulenmaterials (150 mM NaCl in Imidazol-Puffer) werden die Proteine mit einem linearen Gradient (200-500 mM NaCl) eluiert.

2.6.5 Chromatographie mit Galactosamin-Agarose und Arginin-Sepharose 4B

Säulenmaterial	: Galactosamin-Agarose (A) Arginin-Sepharose 4B (B)
Säulenbett	: 1 x 2 cm Volumen: 1,5 ml

Elutionspuffer	:	50 mM Tris-HCl pH 7,4
		150 mM NaCl
		+200 mM Galactosamin (A)
		+200 mM Arginin (B)
Elutionsgeschwindigkeit:		6 ml/h
Fraktionsgröße	:	0,5 ml

50 mg FVIII wird in 5 ml 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,4 gelöst und auf die Säule gepumpt. Das Säulenmaterial wird mit Elutionspuffer (ohne Zusätze) gewaschen. Die Elution erfolgt bei Galactosamin-Agarose mit Puffer A, bei der Arginin-Sepharose 4B mit Puffer B.

2.7 Spaltung des FVIII-Komplexes und Anreicherung von FVIII:C

2.7.1 Spaltung des FVIII-Kompexes

FVIII-Konzentrate werden mit 1 M NaCl, 1M $LiCl_2$ oder 255 mM $CaCl_2$ (in Imidazolpuffer) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert.
Um FVIII:C abzutrennen wird nach der Spaltung eine Gelfiltration durchgeführt. Für die Chromatographie gelten die unter Punkt 2.6.2 beschriebenen Bedingungen. Für die Gelfiltration wird Sepharose CL 6B verwendet. Dem Elutionspuffer wird 1M NaCl, 1M $LiCl_2$ bzw. 255 mM $CaCl_2$ zugesetzt.

2.7.2 Immunaffinitätschromatographie und Spaltung des FVIII-Komplexes

Die Kopplung der monoklonalen Antikörper an unterschiedliche Säulenmaterialien erfolgt wie unter Punkt 2.15 beschrieben. Die mit Antikörper beladenen Gele werden in eine Säule (C 10/20, Pharmacia) gegossen und mit Puffer A gewaschen.

Elutionspuffer: A 20 mM Imidazol pH 7,35
B 20 mM Imidazol pH 7,35
400 mM NaCl
C 20 mM Imidazol pH 7,35
255 mM $CaCl_2$

Das für die Immunaffinitätschromatographie benötigte Plasma wird aus bis zu 5 Tage alten humanen Thrombozytenkonzentraten (DRK - Blutspendedienst, Springe) gewonnen. Die Thrombozyten werden durch Zentrifugation (4000xg, 30 min) sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und nochmals abzentrifugiert. Um restliche Thrombozyten zu entfernen, wird das Plasma durch einen Faltenfilter (Schleicher und Schüll) gegeben und sterilfiltriert (0,22 µm, Millipore).
Das Plasma (20-50 ml) wird mit einer Pumpgeschwindigkeit von 15 ml/h auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit Puffer B wird das Säulenmaterial mit Puffer C äquilibriert. Es folgt eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Danach wird FVIII:C mit Puffer C eluiert. Die Abtrennung des FVIII:vWf vom gebundenen Antikörper erfolgt mit 2 M $MgCl_2$ in Puffer A. Das Säulenmaterial wird mit 20 mM Imidazol (pH 7,35) + 0,02 % (w/v) NaN_3 gewaschen und bei 4 °C gelagert.

2.7.3 Chromatographie mit AH-Sepharose

Säulenmaterial	:	AH-Sepharose (Pharmacia)
Säulenbett	:	4 x 1 cm Volumen: 3 ml
Elutionspuffer	:	20 mM Imidazol pH 7,35 255 mM $CaCl_2$
Elutionsgeschwindigkeit	:	30 ml/h
Fraktionsgröße	:	1 ml

Das Säulenmaterial wird mit 20 mM Imidazol (pH 7,35) äquilibriert. Angereicherter FVIII:C (2.7.2, Immunaffinitätschromatographie) wird mit Imidazol-Puffer 1:10 verdünnt und mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Das Säulenmaterial wird mit Imidazol-Puffer gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgt mit 255 mM $CaCl_2$ (in Imidazol-Puffer).

2.7.4 Hydrophobe Chromatographie

Säule	:	HPLC-Säule Lichrosorb RP 8 7 µm, wide pore,"reversed phase" (Applied Biosystems)
Säulenbett	:	0,21 x 3 cm
Elutionsmittel	:	A 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in H_2O-dest.
		B 0,1% (v/v) TFA 70 % (v/v) Acetonitril
Elutionsgeschwindigkeit	:	0,3 ml/min
Fraktionsgröße	:	0,3 ml

Die für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie verwendete Anlage besteht aus zwei Hochdruckpumpen (2150 HPLC Pump, LKB), einem Steuergerät (2152 LC Controller) und einem Monitor (655 A UV-Monitor,Merck, Hitachi).

Die HPLC-Säule mit umgekehrter Phase trennt nach Hydrophobizität. Durch Immunaffinitätschromatographie angereicherter FVIII:C (0,03 mg/10 ml) wird über eine Probenschleife auf die Säule aufgetragen. Die Säule wird mit Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgt mit folgendem Stufengradienten:

Zeitpunkt (min)	Puffer B (%)
2.	30
30.	70
45.	70
50.	100
55.	100
60.	0
75.	0

Standardläufe werden mit einem Gemisch aus Cytochrom c, BSA, ß-Galactosidase und Ferritin (je 2,5 µg) durchgeführt.

2.8 Aminosäuresequenzierung

Durch Immunaffinitätschromatographie angereicherter FVIII:C wird gegen 10 mM Imidazol-Puffer pH 7,35 über Nacht dialysiert und eingetrocknet (Speed Vac. Conc., Savant). Der Rückstand wird in Probenpuffer aufgenommen und auf ein 6 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (10 µg/Schacht). Nach Auftrennung der Proteine (2.4.1) werden diese elektrophoretisch auf einen vorbehandelten Glasfaserfilter übertragen.

Vorbehandlung des Glasfaserfilters:

1. Inkubation in Trifluoressigsäure	1 h
2. Trocknen im Exikator	2 h

3. Schütteln in 2 % (w/v) Aminopropyl-triethoxylsilan in Aceton/H_2O (19:1) — 2 min
4. Schütteln in Aceton — 10 x 5 min
5. Trocknen bei 110 °C — 45 min

Die Übertragung der Proteine auf Glasfaserfilter wird in der Blotapparatur von Bio-Rad (Trans Blot™ Cell) durchgeführt. Als Transferpuffer dient 50 mM Na-Borat- (pH 8,1), der 20 % (v/v) Methanol enthält. Der vorbehandelte Glasfaserfilter und 2 Stücke Filterpapier (Schleicher und Schüll) werden mit Transferpuffer getränkt. Das Gel wird auf ein Stück Filterpapier gelegt und mit dem Glasfaserfilter bedeckt. Das zweite Filterpapier wird darübergelegt und das Ganze in die Halterung des Blotgerätes gestellt. Eine Spannung von 50 V wird angelegt. Um die optimale Blotdauer zu ermitteln wird nach 5, 10, 20, 30 und 40 min jeweils ein Stück Glasfaserfilter entnommen, 15 min bei 60 °C getrocknet und angefärbt.

Färbung:

1. 1 mg 3,3'- dipentyloxacarbocyanineiodid in 3 ml Methanol lösen und mit 27 ml 0,05 M $NaHCO_3$ pH 8,1 auffüllen
2. Glasfaserfilter 15 min in obiger Lösung schwenken
3. Entfärben in 0,05 M $NaHCO_3$ pH 8,1 + 10 % (v/v) Methanol

Die Detektion der Banden erfolgt bei 254 nm unter der UV-Lampe (HP-Uvis). Die fluoreszierenden Proteinbanden werden aus dem Filter herausgeschnitten.
Die Bindungskapazität des aktivierten Glasfaserfilters beträgt 10 µg Protein/cm^2.

Durchführung der Aminosäuresequenzierung:

Die mit Protein beladenen Filterstücke werden in die dafür vorgesehene Halterung des Aminosäuresequenzers (120 A PTH Analyzer, Applied Biosystems) gelegt. Die Sequenzierung erfolgt mit dem Standardprogramm 03 RPTH (nach Herstellerangaben), das aus einem Vorwaschzyklus (03 CBGN) und einer beliebigen Zahl von Abbauzyklen (03 CPTH) besteht.
Die Auftrennung der PTH-Aminosäuren erfolgt mit Hilfe der HPLC unter folgenden Bedingungen:

Säule	: C 18 ("reversed phase")
Säulenbett	: Linearer Gradient von 10-40 % B, 25 min A.5 % (v/v) Tetrahydrofuran in 0,25 M NaAcetat-Puffer pH 4,2 B.Acetonitril
Elutionsgeschwindigkeit	: 0,2 ml/min
Detektion	: 270 nm
Empfindlichkeit	: 1-2 pmol
Standard	: 25 pmol/Peak

2.9 Allgemeine Zellkulturtechniken

2.9.1 Medienbereitung

Basalmedien:

IF- 1:1 Mischung aus IMDM (Iscove 1978) und F 12 (Ham 1965)
DMEM- Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit 4,5 g Glucose/l (Morton 1970)
RPMI 1640- (Moore et al. 1967)

Die aufgeführten Medien liegen in Pulverform vor und werden von der Fa. Gibco bezogen.
Für die Medienzubereitung wird deionisiertes Wasser verwendet, das durch ein Milli-Q System (Millipore, Bedford, Mass. USA) hochgereinigt ist. Die Zubereitung und Lagerung der Medien erfolgt in detergenzfreien Flaschen. Die Medien werden nach Herstellerangaben gelöst und mit Hilfe eines Druckbehälters und einer Pumpe (KNF Typ MW 63/4, Neuberger) durch zwei sterile Membranfilter (SM 13400, SM 11107, Satorius) geschickt. Die sterilfiltrierten Medien werden in 0,5 l Duran-Schott-Flaschen abgefüllt. Zur Überprüfung der Sterilität wird das Medium 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und schließlich bei 4 °C gelagert.

2.9.2 Kulturbedingungen für Myelomzellen

Die Herstellung von Hybridzellen (2.10.5) erfolgt mit den Myelomzellinien Ag8, NSO und NSI (siehe 2.2). Die Ag8 Myelomzellen werden in RPMI 1640-, die NSI in DMEM- und die NSO in IF-Medium kultiviert. Die Medien enthalten folgende Zusätze:

50 ml FCS (Foetales Kälberserum, Gibco)
5 ml L-Glutamin (200 mM, Boehringer)
2,5 ml Gentamycin (10 mg/ml Biochrom)
auf 500 ml Basalmedium

Die Myelomzellen werden mit 1 x 10^5 Z/ml eingesät und bei einer Zelldichte von 1 x 10^6 Z/ml umgesetzt. Die Myelomzellen müssen sich zum Zeitpunkt der Fusion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, sie müssen also vor der Fusion täglich ausverdünnt und gefüttert werden. Leicht angeheftete Zellen werden durch vorsichtiges Pipettieren abgelöst. Die Zellen werden im Brutschrank (Cytoperm,Heraeus) bei 37 °C, 10 % CO_2 (bei DMEM und RPMI 1640) oder 5 % CO_2 (bei IF-Medium) inkubiert.

2.9.3 Zellzahlbestimmung

Die Gesamtzellzahl wird mit Türks-Lösung (Essigsäure-Gentianaviolettlösung, Merck) bestimmt. Die Milzzellen werden mit Türks-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Durch Türks-Lösung werden die Zellen lysiert. Die gefärbten Zellkerne werden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Erythrozyten werden nicht erfasst, da sie keinen Zellkern besitzen.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird ein Aliquot der Hybridomzellen im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,16 % Trypanblau in isotonischer NaCl-Lösung, Roth). Nur die Zellmembran toter Zellen ist für den Farbstoff durchlässig, lebende Zellen weden nicht angefärbt. Die Anzahl der lebenden und der toten Zellen wird in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.9.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Exponentiell wachsende Myelom- bzw.Hybridomzellen, werden 10 min bei 150xg abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Sediment auf Eis gestellt. Mit einer Zelldichte von 5 x 10^6 pro ml werden die Zellen in kaltem FCS mit 5 % (v/v) DMSO aufgenommen und in 1ml Portionen auf sterile Polypropylenröhrchen (Nunc) verteilt. Die Zellen werden in einer Isolierkanne langsam bei -70 °C eingefroren, oder mit Hilfe eines Kryomats (Cryoson) nach dem Lymphozteneinfrierprogramm des DRK auf -120 °C abgekühlt, bevor sie in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Zum Auftauen werden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt und zweimal mit kaltem serumfreien Medium gewaschen (10 min, 150xg). Das Zellsediment wird in Kulturmedium aufgenommen und mit einer Zelldichte von 5 x 10^5 Z/ml eingesät.

2.10 Herstellung monoklonaler Antikörper

2.10.1 In vivo-Immunisierung

Zur Immunisierung werden 4-6 Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse verwendet.
Die Mäuse werden mit dem Antigen (angereicherter FVIII, siehe 2.6.2) in genauen Zeitabständen immunisiert. Die Antigenlösung wird im Verhältnis 1:1 mit Freund's Adjuvans versetzt und unter Kühlung mit einem Ultraschallgerät (Labosonic 1510, Braun) bei 100 W emulgiert (Wasser-in-Öl Emulsion).

Immunisierungsschema:

Tag 0:	150 µg FVIII/300 µl	subcutan	FAC
Tag 14:	150 µg FVIII/300 µl	subcutan	FAC
Tag 21:	150 µg FVIII/300 µl	intraperitoneal	FAI
Tag 28:	150 µg FVIII/300 µl	intraperitoneal	FAI
Tag 35:	150 µg FVIII/300 µl	intraperitoneal	FAI
Tag 39:	150 µg FVIII/300 µl	intraperitoneal	FAI

Die Fusion erfolgt vier Tage nach der letzten Immunisierung, da zu diesem Zeitpunkt die Anzahl immunkompetenter B-Lymphozyten in der Milz am höchsten ist (Hämmerling 1981).

2.10.2 Bestimmung des Antikörpertiters im Serum immunisierter Mäuse

Für eine hohe Ausbeute an antigenspezifischen Klonen ist die Induktion antigenspezifischer B-Lymphozyten und die Gewinnung und Fusion dieser Zellen zum Zeitpunkt ihrer größten Aktivität entscheidend (Peters et al. 1985).
Vor der Blutentnahme aus der Schwanzvene wird die Maus einer fünfminütigen Infrarotbestrahlung ausgesetzt. Das entnommene Blut (ca. 300 µl) wird in ein Eppendorfgefäß gefüllt und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Koagulation des Blutes werden die Proben in ein Eisbad gestellt und über Nacht im Kühlraum aufbewahrt. Anschließend wird der Blutkuchen sedimentiert (8000xg, 15 min). Das Serum wird entnommen und in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:20 bis 1:640) im ELISA (2.11.2) getestet.

2.10.3 In-vitro Immunisierung

Die in-vitro Immunisierung von Milzzellen und deren Fusion wird nach einer modifizierten Vorschrift von Reading (1982) durchgeführt.
Mit Hilfe der in-vitro Immunisierung ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit immunkompetente, proliferierende B-Lymphozyten zu erhalten. Aus Balb/c Mäusen isolierte Milzzellen werden mit dem Antigen 3 Tage in Thymozyten-konditioniertem Medium inkubiert.

Herstellung von Thymozyten-konditioniertem Medium:

Aus vier Wochen alten Balb/c Mäusen werden die Thymusdrüsen steril entnommen, mehrmals mit DMEM-Medium gewaschen und durch ein Gewebesieb (Porengröße 94 µm, Bellco Glass Inc.) passiert. Die Zellaggregate werden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit einer 10 ml Pipette zerteilt. Die Thymuszellen werden mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt und mit einer Zelldichte von 5×10^6 Z/ml in 50 ml Zellkulturflaschen eingesät. Das Kulturmedium besteht aus DMEM mit 20 % FCS und 5×10^{-5} M Mercaptoethanol. Die Zellen werden 2 Tage im Brutschrank bei 37 °C, 10 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchte kultiviert. Danach werden die Zellen 10 min mit 250xg abzentrifugiert. Der Überstand wird sterilfiltriert (0,2 µm Filter, Millipore), aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

In-vitro Immunisierung isolierter Milzzellen

Die Milzzellpräparation wird, wie unter Punkt 2.10.4 beschrieben, mit drei Balb/c Mäusen durchgeführt. Die gewaschenen Milzzellen werden in DMEM-Medium (20 % FCS, 20 mM Glutamin) aufgenommen. Die Zelldichte wird auf 6×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

Die Zellsuspension wird im Verhältnis 1:1 mit Thymozyten-konditioniertem Medium gemischt. 2 µg FVIII (siehe 2.6.2) pro ml Medium wird hinzugefügt. Da eine Sterilfiltration des Antigens nicht möglich ist (hohe Verluste), wird es vor der Zugabe zum Medium einer UV-Bestrahlung unterzogen (20 min, 260 nm). Zwei mittlere Gewebekulturflaschen werden mit jeweils 20 ml der Zellsuspension gefüllt und über drei Tage im Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO_2 inkubiert. Die Milzzellen werden abzentrifugiert (10 min, 150xg) und zweimal mit DMEM gewaschen.
Die Fusion der Milzzellen mit Myelomzellen (NSI) wird entsprechend der unter Punkt 2.10.5 beschriebenen Methode durchgeführt.

2.10.4 Milzzellpräparation

Eine 6 bis 8 Wochen alte Balb/c Maus wird durch Kohlensäuregas getötet, kurz in Ethanol getaucht und auf einer Präparationsplatte mit Nadeln fixiert. Fell und Bauchdecke werden aufgeschnitten und die Milz steril entnommen. Die Milz wird in eine Petrischale mit 10 ml serumfreiem Medium gelegt. Eine 10 ml Spritze wird mit serumfreiem Medium gefüllt und die Kanüle vom Ende her in die Milz eingestochen. Die andere Ende wird mit einer Schere eingeschnitten. Die Milz wird mit Medium durchgespült, sodaß die Zellsuspension am aufgeschnittenen Ende herausquillt. Die Zellen werden zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen (10 min, 150xg). Das verwendete Medium richtet sich nach der Myelomzellinie, die für die Fusion eingesetzt wird (siehe 2.9.2).
Zur Herstellung eines Feeder-Layers werden die Milzzellen in HAT-Selektionsmedium (siehe 2.10.6) aufgenommen und mit einer Zelldichte von 10^6 Z/ml in acht Mikrotiterplatten (Nunc) eingesät. Das Verteilen der Milzzellsuspension erfolgt mit einer Pasteurpipette.

Es werden je zwei Tropfen pro Mikrotiterloch pipettiert. Um Verdunstungsverluste und die Gefahr von Infektionen zu verringern, werden die äußeren Löcher der Platte mit einer 2 %igen (w/v) Kupfersulfat-Lösung gefüllt. Zur Konditionierung des Mediums werden die Platten über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.10.5 Zellfusion

Da antikörperbildende Lymphozyten aus der Mäusemilz in Kultur nicht überlebensfähig sind, werden sie mit Maus-Myelomzellen (Permanentlinien aus Tumoren von B-Lymphozyten) fusioniert und somit immortalisiert.
Die Durchführung der Fusion erfolgt in Anlehnung an die von Köhler und Milstein (1976) und Gefter et al. (1977) beschriebene Technik, nach der Vorschrift von Campbell (1984).

1) Die Milzzellen immunisierter Mäuse werden, wie unter Punkt 2.10.4 beschrieben, isoliert und dreimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen (jeweils 10 min bei 150xg). Myelomzellen (2.9.2), die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, werden abgeerntet und 10 min bei 150xg (Minifuge 2, Heraeus-Christ) abzentrifugiert. Milzzellen und Myelomzellen werden jeweils in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen und die Zellzahl wird bestimmt (2.9.3.).

2) Milz- und Myelomzellen im Verhältnis 5:1 mischen und 10 min bei 150xg sedimentieren

3) Überstand absaugen, das Röhrchen mit dem Zellsediment in ein Wasserbad (37°C) stellen und 2 ml einer auf 37 °C vorgewärmten PEG-Lösung (PEG 1500, 0,5 g/ml, Boehringer) über 30 sec tropfenweise zugeben.

4) Das Röhrchen über 30 sec leicht bewegen und die Zellen durch sanftes Pipettieren mit einer 2 ml Pipette suspendieren

5) 30 sec bei 37 °C stehenlassen

6) 5 ml serumfreies Medium über 2 min zutropfen

7) Weitere 5 ml Medium etwas zügiger hinzugeben und 3 min stehenlassen

8) 10 min bei 150xg abzentrifugieren

9) Überstand absaugen; das Zellsediment in 40 ml komplettes HAT-Medium (siehe 2.10.4) aufnehmen und auf die am Vortag vorbereiteten Feeder-Layer-Platten (siehe 2.10.4) pipettieren. Pro Platte werden 5 ml Zellsuspension tropfenweise verteilt.

2.10.6 Kultivierung der Hybridzellen

Hybridzellen, die aus einer Fusion mit NSO-Myelomzellen hervorgegangen sind, werden in IF-Medium (5 % CO_2) kultiviert, Hybridome aus einer NSI-Fusion in DMEM (10 % CO_2) und Hybridome aus einer Ag8-Fusion in RPMI 1640 (10 % CO_2).

Die Zubereitung der Basalmedien ist unter Punkt 2.9.1 beschrieben. Für die Kultivierung der Hybridomzellen werden folgende Medienzusätze eingesetzt.

Kulturmedien für Hybridzellen:
Alle Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 500 ml gebrauchsfertigem Medium. Foetales Kälberserum (FCS) wird vor Gebrauch 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

Zusätze für IF-Medium:

50	ml FCS (Gibco)
5	ml L-Glutamin (200 mM, Boehringer)
5	ml Gentamycin (10 mg/ml, Biochrom)
1	ml Penicillin/Streptomycin (50000 IU/50 mg) (Boehringer)
0,5	ml Monothioglycerol (1:1000 in Medium verdünnt) (Sigma)

Zusätze für DMEM-Medium:

50	ml FCS (s.o.)
5	ml L-Glutamin (s.o.)
1	ml Penicillin/Streptomycin (s.o.)
5	ml MEM-nicht essentielle Aminosäuren (100x, Gibco)
5	ml Natriumpyruvat (100 mM, Gibco)
5	ml HEPES (1 M, Serva)
0,5	ml 2-Mercaptoethanol (1:1000 in Medium verdünnt) (Serva)

Zusätze für RPMI-Medium:

50	ml FCS (s.o.)
5	ml Gentamycin (s.o.)
1	ml Penicillin/Streptomycin (s.o.)
5	ml Vitamine (s.o.)
5	ml Natriumpyruvat (s.o.)
0,5	ml 2-Mercaptoethanol (s.o.)

Der Fusionsansatz wird mindestens zwei Wochen im HAT-(Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) Selektionsmedium kultiviert.

HAT-Selektionsmedium:
2 ml HAT-Konzentrat (50x, Boehringer)
8 ml HT-Konzentrat (50x, Boehringer)
auf 500 ml Kulturmedium (siehe oben)

Danach wird ca. drei Wochen mit HT-Medium (10 ml HT-Konzentrat auf 500 ml Medium) gefüttert.

Die ersten Hybridklone sind eine Woche nach der Fusion zu erkennen. Die Zellen werden mit HAT-Medium nachgefüttert. Ungefähr 14 Tage nach der Fusion werden die Überstände auf ihren Antikörpergehalt mittels ELISA (2.11.1) getestet. Antikörperproduzierende Hybridome werden weiterkultiviert und alle zwei Tage nachgefüttert.
Mit Hilfe von ELISA (2.11.2), Immunfluoreszenz (2.11.6) und Immunpräzipitation (2.11.8) werden diejenigen Hybridome ermittelt, die antigenspezifische Antikörper produzieren. Die positiven Klone werden schrittweise in immer größeren Kulturgefäßen hochgezüchtet. Der jeweilige Zeitpunkt für das Umsetzten ist erreicht, wenn ca. 75 % der Bodenfläche mit Zellen besetzt ist. Ein Teil der Zellen wird eingefroren (2.9.4), mit den restlichen Zellen werden Klonierungen durchgeführt.

2.10.7 Klonierung durch Einzelzellverdünnung

Hybridzellen, die antigenspezifische Antikörper produzieren, werden mit Medium (2.10.6) auf eine Zelldichte von 100, 10 und 3 Z/ml verdünnt und in Mikrotiterplatten mit einem Feeder-Layer aus Milzzellen eingesät (100 µl/Loch). Die Herstellung des Feeder-Layers (siehe 2.10.4) erfolgt einen Tag vor der Klonierung.

Wird die Klonierung ohne Milzzellen durchgeführt, so werden die Zellen in Medium mit folgenden Zusätzen verdünnt und in Mikrotiterplatten eingesät:

1) 2,5 % (v/v) ESG (Hybridoma Wachstumsfaktor, Costar Biologicals)
2) 20 % (v/v) HECS (Überstand von kultivierten humanen Endothelialzellen)

Zum Zeitpunkt der Klonierung müssen sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.
Vier Tage nach der Klonierung werden die Platten unter dem Mikroskop auf wachsende Einzelklone hin überprüft. Da das Wachstum der Hybridklone sehr stark variieren kann, müssen die Platten täglich kontrolliert und gut wachsende Klone nachgefüttert werden. Wenn ca. 50 % der Bodenfläche eines Mikrotiterloches mit Zellen bedeckt ist, wird der Klon auf Antikörperproduktion getestet (2.11.2, 2.11.6). Positive Klone werden wie unter Punkt 2.10.6 beschrieben, kultiviert und genügend Zellmaterial wird eingefroren (2.9.4).

2.10.8 Klonierung in Weich-Agar

Die Klonierung in Weich-Agar wird nach einer modifizierten Vorschrift von Campbell (1984) durchgeführt.

Agar-Medien:

1) 0,5 % (v/v) Agar (Difco) in Kulturmedium (2.10.6) mit Milzzellen ($1x10^6$/ml) aus Balb/c Mäusen

2) 0,5 % (v/v) Agar in Kulturmedium mit 2,5 % ESG (Hybrioma Wachstumsfaktor, Costar Biologicals) und 10 % HECS (Überstand von humanen Endothelialzellen, Costar Biologicals)

In Petrischalen (Duchmesser 6 cm) wird mit 7 ml der Lösung 1 bzw. 2 eine Bodenschicht gegossen. 1 ml Zellsuspension wird mit 2 ml Lösung 2 gemischt und auf den Bodenagar verteilt. Die Zelldichte beträgt 250, 500, 1000, 2000, und 4000 Zellen pro 3 ml. Zwei dieser Petrischalen und eine mit 2 % (w/v) Kupfersulfatlösung gefüllte Schale werden in eine große Petrischale gestellt und im Brutschrank inkubiert. Nach 7 bis 10 Tagen sind Zellkolonien sichtbar. Unter optischer Kontrolle (Diavert, Leitz) werden die Klone mit Hilfe einer Eppendorfpipette gepickt, d.h. durch rasches Aufziehen des Kolbens in die Pipette hineingezogen. Die Klone werden in Mikrotiterplatten weiterkultiviert (2.10.6) und auf Antikörperproduktion (2.11.2, 2.11.6) getestet.

2.10.9 Klonierung in Methylzellulose

Die Hybridzellen werden sedimentiert (150xg, 10 min), und in Kulturmedium, das 2 % (w/v) Methylzellulose und 10 % HECS enthält, aufgenommen. Jeweils 8 ml dieser Zellsuspension werden in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gegossen. Pro Schale werden 5×10^4, 1×10^5, $2{,}5 \times 10^5$ bzw. 5×10^5 Zellen eingesetzt.
Nach einer Woche sind Zellkolonien makroskopisch sichtbar, sie werden gepickt und in Mikrotiterplatten weiterkultiviert. Mittels ELISA (2.11.2) und Immunfluoreszenzmikroskopie (2.11.6) werden die Klone auf antigenspezifische Antikörperproduktion untersucht. Positive Klone werden wie unter Punkt 2.12.6 beschrieben weiterkultiviert.

2.10.10 Massenzellkultur klonierter Hybridzellen

Antikörperproduzierende Hybridomzellen werden nach der Reklonierung schrittweise in immer größeren Kulturgefäßen (50, 250, 500 ml Zellkulturflaschen) vermehrt. Durch stufenweise Reduktion des Serumzusatzes werden die Hybridzellen langsam an serumfreies Medium adaptiert. Die Zellen werden in DIF-Medium (Definiertes Medium auf IF-Basis, Diplomarbeit Volker Jäger, 1984) weiterkultiviert.

DIF-Medium

2	mmol	Na-Pyruvat (Gibco)
2	mmol	L-Glutamin (Boehringer)
62,5	mg	Gentamycin (Biochrom)
10	mg	Insulin (Sigma)
10	mg	Transferrin (Behring)
500	mg	BSA/Ölsäure (s.u.)
		auf 1 l IF-Medium

Herstellung von BSA/Ölsäure:

Alle 2-4 Wochen wird eine frische 100fache Stammlösung des BSA/Ölsäure Komplexes hergestellt. 20 µl einer frisch angesetzten Ölsäurelösung (20 mg/ml in Ethanol) werden tropfenweise zu 1 ml FAF-BSA (globulin- und fettsäurefreies Rinderalbumin, Sigma) hinzugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei 4 °C langsam gerührt, sterilfiltriert (Millex-GS, 0,22 µm Porengröße, Millipore) und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Zur Gewinnung größerer Antikörpermengen werden die Hybridzellen in einem Hohlfaserreaktor (Fresenius) kultiviert. Mit $5,4 \times 10^7$ Zellen in 260 ml Medium II(s.u.) wird der Reaktor angeimpft.

Die Zellen, die im Reaktor an der Außenseite der Hohlfasern wachsen, werden kontinuierlich mit Medium I versorgt, das durch das Innere der Hohlfasern geleitet wird. Die Ausschlußgrenze der Hohlfasern beträgt 6500. Die für das Wachstum der Zellen erforderlichen Nährstoffe können ungehindert passieren; die von den Zellen produzierten Antikörper werden zurückgehalten und bleiben im Zellkulturüberstand.
Die Kulturdauer beträgt 41 Tage. Nach 23 Tagen wird 50 ml Kulturüberstand entnommen. Danach wird alle drei Tage ca. 40 ml geerntet.
Die Fermentation der antikörpersezernierenden Hybridzellen wurde von Dipl. Biol. Volker Jäger (Abt. Bioverfahrenstechnik, GBF) durchgeführt.

Medium I

2 mmol	Na-Pyruvat
2 mmol	L-Glutamin
100 mg	Gentamycin
	auf 1 l IF-Medium

Medium II

10 mg	Insulin
10 mg	Transferrin
500 mg	BSA/Ölsäure (s.o)
	auf 260 ml IF-Medium

2.11 Immunologische Methoden zum Nachweis von Antikörper oder Antigen

2.11.1 ELISA zum Nachweis von Maus-Immunglobulinen

Der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) wird nach der Fusion (2.10.5) eingesetzt, um aus einer Vielzahl von Klonen diejenigen Klone herauszufinden, die Maus IgG bzw. IgM sezernieren.
Dazu werden Ziegenantikörper, die gegen Maus IgG und IgM (GAM IgG + IgM) gerichtet sind, an eine Immunoplatte (442404, Nunc) gebunden. Nach Absättigen aller unspezifischen Bindungen wird mit Hybridomaüberstand inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wird die Platte mit enzymmarkierten Immunglobulinen, die gegen Maus IgG und IgM gerichtet sind, inkubiert. Gebundene Immunglobuline aus dem Hybridomaüberstand können nun mit Hilfe einer von dem eingebrachten Enzym katalysierten Farbreaktion nachgewiesen werden.

Durchführung:
Eine Immunoplatte wird nacheinander mit folgenden Lösungen inkubiert bzw. gewaschen.

1) GAM IgG + IgM (Medac), 1:1000 in PBS verdünnt, 100 µl/Mikrotiterloch, Inkubation über Nacht bei 4 °C

PBS: 8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$
0,2 g KH_2PO_4
in 1 l H_2O-dest.

2) Absättiger: 2,5 % (w/v) BSA
10 % (v/v) Pferdeserum
in PBS
300 µl/Loch, Inkubation: 2 h bei Raumtemperatur

3) 4 x waschen mit PBS

4) Hybridomaüberstand, 100 µl/Loch, außer Reihe 1, die mit Medium gefüllt wird (Nullkontrolle)
Inkubation: 2 h bei Raumtemperatur

5) 4 x waschen mit PBS, 2 x mit 0,2 % (w/v) BSA in PBS

6) GAM IgG + IgM alkalische Phosphatase gekoppelt (Medac), 1:1000 in 0,2 % (w/v) BSA, 100 µl/Loch
Inkubation: 2 h bei Raumtemperatur

7) 4 x waschen mit PBS

8) 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in
10 % (v/v) Diethanolamin pH 9,8
100 µl/Loch, Inkubation: 30 min

Die Auswerung erfolgt mit Hilfe des "Mikroelisa Auto Readers" (MR 580, Dynatech) bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen die Referenzwellenlänge von 450 nm.
Wenn ausreichende Mengen an gereinigtem Antigen zur Verfügung stehen (bei Fibrinogen und Fibronectin), wird die Fusion direkt auf antigenspezifische Antikörper getestet.

2.11.2 ELISA zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper

In die Löcher einer Immunoplatte werden 100 µl Antigenlösung (100 µg/ml) pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Platte wird ausgeschlagen, mit Absättiger gefüllt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotiterplatte wird viermal mit PBS gewaschen und die Überstände von Maus Ig sezernierenden Hybridomem werden in die Mikrotiterlöcher pipettiert (100 µl/Loch). Die Platte wird, wie in Abschnitt 2.11.1 (ab Punkt 5.) beschrieben, weiterbehandelt.

2.11.3 ELISA zur quantitativen Antikörperbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des IgG-Gehalts in Überständen monoklonaler Hybridklone wird der ELISA nach einer Vorschrift der Fa. Biotest (Dr. D. Rohm, persönliche Information) durchgeführt.

Lösungen:

1) GAM IgG (Ziege anti Maus IgG, Tago) 1:400 in
   0,1 M Na-Carbonat pH 9,4

2) 0,05 % (v/v) Tween 20 in H_2O-dest.

3) 0,137 M Phosphatpuffer pH 7,0
   10 % (v/v) FCS

4) PBS-Gelb: 0,10 g Tartrazin
   1,10 g Na_2HPO_4
   0,30 g NaH_2PO_4
   8,75 g NaCl
   in 1 l H_2O-dest.
   pH 7,2

5) PBST-Blau:
- 1,10 g Na_2HPO_4
- 0,30 g NaH_2PO_4
- 8,75 g NaCl
- 0,04 g Äthylmercurithiosalicylsäure-Na-Salz
- 1,80 g BSA
- 0,10 g Alphazurine A
- 1,65 g Chloramphenicol
- 0,03 g Neomycinsulfat
- 0,50 ml Tween 20

in 1 l H_2O-dest.
pH 7,2

6) Konjugatlösung:
GAM IgG Peroxidase gekoppelt (Tago) 1:2000 in PBS-Tween/FCS (1:1)

PBS-Tween:
- 1,10 g Na_2HPO_4
- 0,30 g NaH_2PO_4
- 8,75 g NaCl
- 1,00 g Äthylmercurithiosalicylsäure-Na-Salz
- 0,5 ml Tween 20

in 1 l H_2O-dest.
pH 7,2

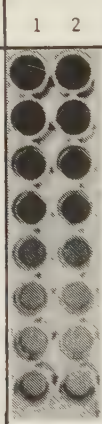
7) Substratpuffer:

- 14,8 g Na_3PO_4
- 7,2 g Citronensäure-1-hydrat
- 0,1 g Äthylmercurithiosalicylsäure-Na-Salz
- 0,6 ml H_2O_2 (30%)

in 1 l H_2O-dest.
pH 5,5

kurz vor Verwendung 3 mg OPD (o-Phenylendiamin)/ml zusetzen

Die für die Herstellung der Lösungen verwendeten Glasartikel werden mit 3,5 % (v/v) Salzsäure gesäubert, mehrmals mit H_2O-dest. gewaschen und getrocknet. Die Lösungen werden bei 4 °C aufbewahrt.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			←		1 :		200			→	1 :	20 000
B					1 :		400				1 :	40 000
C					1 :		800				1 :	80 000
D					1 :	1	600				1 :	160 000
E					1 :	3	200				1 :	320 000
F					1 :	6	400				1 :	640 000
G					1 :	12	800				1 :	1 280 000
H					1 :	25	600				Leerwert	
	Kulturüberstände										Standard	

Abb. 5: Schema einer Mikrotiterplatte
Verdünnung der Proben und des Standards bei der Duchführung des ELISA zur Bestimmung der Antikörperkonzentration in Hybridomaüberständen
(Erläuterung im Text S.55 Schritt e.)

Durchführung:

a) Beschichten mit anti-Maus Antikörper
Die Beschichtung der Mikrotiterplatte (Immunoplatte 442404 Nunc) mit anti-Maus Antikörper erfolgt mit Lösung 1 (100µl/Loch), bis auf die Mikrotiterlöcher H 11 und H 12 (Nullkontrolle), die mit Puffer gefüllt werden. Inkubation: 1 Stunde bei Raumtemperatur

b) Waschen
Die Platten werden 6x mit Lösung 2 überflutet, entleert und trocken geschlagen.

c) Absättigen
Die Platte wird mit Lösung 3 (jeweils 100 µl/Loch)
30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

d) Probenvorbereitung
Die zu untersuchenden Proben (Kulturüberstände) 1:100 mit PBS-Gelb (Lösung 4) verdünnt. Der Standard (1 mg Maus-IgG, Sigma) wird in 1 ml 0,137 M Phosphatpuffer (pH 7) gelöst und 1:1000 mit Phosphatpuffer verdünnt. Aus dieser Stammlösung wird eine 1:10 Verdünnung mit PBS-Gelb erstellt.

e) Probenauftrag
Die ELISA-Platte wird wie unter b) gewaschen und mit PBST-Blau (Lösung 5, 100 µl/Loch) beschickt. Die Probenverdünnungen (1:100) werden in die Löcher 1-10 (jeweils 100 µl) der Reihe A pipettiert und nach H titriert (A=1:200, H=1:25 600). Es werden Doppelbestimmungen duchgeführt.
Proben mit hoher Antikörperkonzentration, z.B. durch Ammoniumsulfatfällung konzentrierte Kulturüberstände, werden entsprechend stärker verdünnt.

Die Standardverdünnung wird 100-µl-weise in den Reihen 11 und 12 von A bis F runtertitriert (1:20 000 bis 1:1 280 000, H als Leerwert).
Inkubation: 1 Stunde bei Raumtemperatur

f) Beschichtung mit Konjugat
Nach erneutem Waschen (b) der Platten werden alle 96 Mikrotiterlöcher mit 100 µl Lösung 6 beschichtet und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

g) Beschichtung mit Substrat
Die Platten werden gewaschen (b), mit Lösung 7 beschickt (100µl/Loch), 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit 20 % (v/v) Schwefelsäure (100 µl/Loch) gestoppt.
Gemessen wird im ELISA-Reader (NJ 2000, Nunc) bei einer Testwellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm.

Mit Hilfe der verschiedenen Verdünnungsstufen der als Standard dienenden Maus-IgG Lösung wird eine Eichreihe erstellt. Die Steigung der Geraden wird ermittelt. Als Kontrolle für die Genauigkeit der Titration im ELISA, wird der Korrelationskoeffizient der einzelnen Datenpunkte in Bezug auf die angenäherte Gerade bestimmt (ideale Korrelation = 1).
Für die Proben werden entsprechende Berechnungen durchgeführt. Der Antikörpergehalt der Proben wird anhand folgender Formel berechnet:

$$K_P = \frac{T_P}{T_S} \times K_S$$

K= Antikörperkonzentration
P= Probe S= Standard
T= Antikörpertiter
bei OD=0,5

2.11.4 ELISA zur Bestimmung der Antikörpersubklassen

Die Subklassenbestimmung erfolgt mit einem Test-Set der Fa. Zymed (MonoAb-ID EIA Kit).

1) Zwei Immunoplatten werden mit Ziege anti-Maus Antikörper (GAM, 1:50 in PBS verdünnt, 50 µl/Loch, Reihen 1-9) beschickt und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

2) Absättigen mit 0,5 % (w/v) BSA in PBS, 1 h 37 °C

3) BSA-Lösung abgießen und Platte mit Kulturüberstand (50 µl/Loch) beschicken. Zweite Platte (Kontrolle) mit Antikörper bekannter Subklasse (Zymed Mouse Myelom Panel, 1 mg/ml, 1:1000 in PBS verdünnt, 50 µl/Loch) beschicken. Inkubation: 1 h 37 °C

4) Beide Platten 4x mit 0,2 % (v/v) Tween 20 in PBS waschen.

5) In Reihe 1 Kaninchenserum (50 µl/Loch) und in die Reihen 2-9 subklassenspezifische Kaninchen anti-Maus Antikörper pipettieren. Inkubation: 1 h 37 °C

6) Waschen wie bei 4) und Platten mit alkalischer Phosphatase konjugierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper (GAR, 1:50 in 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS) beschickt. Inkubation: 1 h 37 °C

7) Nach erneutem Waschen (4) wird 100 µl Substratlösung : 0,1 % (w/v) p-Nitrophenylphoshat in
0,1 M 2-amino-2-methyl-1,3-propandiol pH 10
pro Loch pipettiert. Nach 30 min Inkubationszeit wird die Gelbfärbung mit dem Mikroelisa Auto Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen die Referenzwellenlänge von 577 nm gemessen.

2.11.5 Immunblottechnik

2.11.5.1 Elekrophoretische Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose

Die durch SDS-PAGE (2.4.1) aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch auf Nitrozellulose übertragen (modifiziert nach Towbin et al. (1979). Diese Immobilisierung ermöglicht es, Bindungsstudien mit Antikörpern (2.11.5.3) durchzuführen.
Die Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose (BA 85, 0,45 µm, Schleicher und Schüll) erfolgt mit Hilfe der Blotapparatur von Bio-Rad (Trans Blot Cell, 250/ 2.5). Als Transferpuffer dient Elektrophoresepuffer (2.4.1), dem 20 % (v/v) Methanol zugesetzt wird. Nitrozellulose und zwei Stücke Filterpapier in der Größe des Gels, werden mit Transferpuffer getränkt. Das Gel wird auf eines dieser Filterpapiere gelegt und luftblasenfrei mit der Nitrozellulose bedeckt. Das zweite Filterpapier wird darüber gelegt und alles in die dafür vorgesehene Kunststoffhalterung des Blotgerätes gestellt. Die Blotdauer beträgt bei 50 V Spannung 1 Stunde. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wird das Gerät in ein Eisbad gestellt. Da bei der Bindung der Proteine an Nitrozellulose Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Bindungen und Ionenbindungen eine Rolle spielen, ist die Wahl des Blotpuffers und des Blotpapiers vom jeweiligen Transferproblem abhängig (Peters et al. 1985).
Nach dem Blotten wird ein Stück Nitrozellulose abgeschnitten und gefärbt. Dies geschieht durch fünfminütiges Schütteln in einer wässrigen Lösung aus 0,1 % (w/v) Amidoschwarz, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure. Entfärbt wird mit 45 % (v/v) Methanol, 45 % (v/v) H_2O, 5 % (v/v) Essigsäure. Die gefärbte Nitrozellulose wird nach dem Trocknen lichtgeschützt aufbewahrt.

Empfindlicher als die stöchiometrische Proteinfärbung mit Amidoschwarz ist die Bindung von Tusche an immobilisierte Proteine (Hancock und Tsang 1983).
Nach erfolgtem Transfer wird die Nitrozellulose kurz in PBS (2.11.1) gewaschen und über Nacht in Färbelösung gelegt. Die Färbelösung aus 0,2 % (v/v) Fount India (Pelikan AG) + 0,3 % (v/v) Tween 20 (in PBS) ist nur wenige Tage haltbar, muß also immer frisch angesetzt werden. Die gefärbte Nitrozellulose wird in Wasser aufbewahrt. Ein besonderes Entfärben ist nicht notwendig.

2.11.5.2 Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose durch Diffusion

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarose-Gel (2.4.5) werden die Proteine auf Nitrozellulose übertragen. Dazu legt man das Gel auf einen Stapel mit Laufpuffer angefeuchteter saugfähiger Tücher (Kleenex), der mit einem Stück Filterpapier bedeckt ist. Auf das Gel wird ein Stück feuchte Nitrozellulose luftblasenfrei aufgebracht. Es folgt ein Stück trockenes Filterpapier und ein Stapel trockener Tücher. Das Ganze wird mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht beschwert.
Innerhalb von 2 Stunden findet mit dem kontinuierlichen Aufsteigen des Puffers der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose statt. Ein Stück der Nitrozellulose wird, wie unter Punkt 2.11.5.1 beschrieben, angefärbt.

2.11.5.3 Immunfärbung von immobilisierten Proteinen

Mit den an Nitrozellulose immobilisierten Proteinen werden Bindungsstudien mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wird diese 2 Stunden in Absättiger (2.11.1) geschwenkt, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Danach wird die Nitrozellulose in 5 mm breite Streifen geschnitten und mit Kulturüberstand von Hybridzellen mindestens 2 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle wird Maus IgG (10 µg/ml, Sigma) und als Positivkontrolle polyklonales Antiserum (Clotimmun, Behring AG, 1:100 in Absättiger) eingesetzt. Die Nitrozellulosefilter werden 3 x 10 min in PBS (2.11.1) gewaschen. Zur Detektion gebundener Mausantikörper werden die Filter mit Ziege anti-Maus Antikörper (Positivkontrolle: anti-Kaninchen Antikörper) 2 Stunden lang inkubiert. Diese Antikörper sind entweder mit FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) oder einem Enzym (alkalische Phosphatase oder Peroxidase) markiert. FITC-gekoppelte Antikörper werden 1:100, enzymmarkierte Anikörper 1:500 in Absättiger verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden werden die Filter 3 x 10 min in PBS gewaschen.
Die Auswertung der Filter, die mit FITC-gekoppelten Antikörper inkubiert wurden, erfolgt unter UV-Licht (366 nm). Wurden enzymmarkierte Antikörper eingesetzt, so erfolgt eine Inkubation mit entsprechender Substratlösung.

Färbelösung (alkalische Phosphatase):

9 ml Glycinpuffer: 100 mM Glycin
10 mM $MgCl_2$
10 mM $ZnCl_2$
pH 10,4
1 ml Nitroblautetrazolium (1 mg/ ml Glycinpuffer)
0,1 ml 5'-Bromo-4-chloroindoxylphosphat
(5 mg/ml in Dimethylformamid)

Färbelösung (Peroxidase):

3 ml 0,3 % (v/v) 4-Chlor-1-Naphtol in Methanol
47 ml PBS
20 µl 30 % H_2O_2 (kurz vor Verwendung zugeben)

Bei Verwendung von Peroxidase-gekoppelten Antikörpern, dürfen keine Azid-haltigen Lösungen eingesetzt werden. Nach ausreichender Anfärbung der Banden wird die Lösung dekantiert und die Nitrozellulose mit H_2O-dest. gewaschen.

2.11.6 Immunfluoreszenzmikroskopie mit adhärenten Zellen

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wird mit humanen Endothelialzellen, AKR 431-, Swiss 3T3-, Balb/c- und FS4-Zellen durchgeführt.
Die in einer Mikrotiterplatte konfluent gewachsenen Zellen werden 3 x mit PBS (2.11.1) gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 70 % (v/v) Ethanol (100 µl/Loch) 30 min bei 4 °C. Anschließend werden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit Absättiger (2.11.1) eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dem Absättigen wird die Platte mit 100 µl Hybridomaüberstand pro Mikrotiterloch beschickt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle dient ein polyklonales Antiserum gegen FVIII:vWf, als Negativkontrolle wird Maus IgG (20 µg/ml) eingesetzt. Nach erneutem Waschen erfolgt eine zweistündige Inkubation bei 37 °C mit einem FITC-markiertem Ziege anti-Maus Antikörper (1:50 in Absättiger, Sigma). Die Positivkontrolle wird mit einem FITC-markiertem Ziege anti-Kaninchen Antikörper (Sigma) inkubiert. Die Platte wird 3x mit PBS gewaschen und mit 50 µl PBS + 2 % (v/v) Glycerin pro Loch gefüllt.

Die Fluoreszenzfärbung wird in einem Zeiss Inversionsmikroskop betrachtet und mit einem 29 Din Umkehrfilmen photographiert.

Filterkombination:	BP 546	450-490
	FT 580	FT 510
	LP 590	520-560

2.11.7 Immunfluoreszenzmikroskopie mit Thrombozyten

Eine Mikrotiterplatte wird mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml in PBS) beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wird 3x mit PBS gewaschen. Eine Blutplättchensuspension von 5 x 10^7 Z/ml wird aus einem 2 Tage alten humanen Thrombozytenkonzentrat (DRK- Blutbank Springe) hergestellt. Die Thrombozyten werden 10 min bei 150xg abzentrifugiert und einmal in Waschlösung I (120 mM NaCl, 12,9 mM Na-Citrat, 30 mM Glucose und zweimal in Waschlösung II (10 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) gewaschen.
Die Mikrotiterplatte wird mit der Thrombozytensuspension (100 µl/Loch) beschickt und 30 min mit 1600 Upm (Minifuge 2, Rotor NR 3471, Heraeus Christ) zentrifugiert. Die Fixierung der Thrombozyten erfolgt mit 1 % (v/v) Formaldehyd (200 µl/Loch, in PBS). Nach einer Inkubationszeit von 30 min werden die Thrombozyten 3x mit PBS gewaschen. Die weitere Durchführung erfolgt wie unter Punkt 2.11.6 beschrieben.

2.11.8 Immunfällung mit ^{125}J-markierten Proteinen

Die Markierung von Proteinen mit ^{125}J wird mit Hilfe des Lactoperoxidase - Glucose Oxidase Systems (Solid Phase System for Radioionidation, Bio Rad).

Das im Test-Set enthaltene "Enzymobead-Reagenz" besteht aus immobilisierten Präparationen der Enzyme Lactoperoxidase und Glucose Oxidase. Zu 50 µl von diesem Reagenz werden 10 µl einer Glucoselösung (90 mg/ml), 50 µl Proteinlösung (angereicherter FVIII, siehe 2.6.2, 0,16 mg/ml) und 1 mCi $Na^{125}J$ Amersham) hinzugegeben. Während einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur wird die Glucose unter Freisetzung von H_2O_2 oxidiert. Die Lactoperoxidase katalysiert die Umsetzung von Jodid ($^{125}J^-$) zum Jod ($^{125}J_2$), das mit dem Protein reagieren kann. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl einer NaN_3-Lösung (0,5%) und 10 µl einer $Na_2S_2O_3$-Lösung (0,05 M) gestoppt. Nach 5 min Inkubationszeit werden 13 µl einer BSA-Lösung (10 mg/ml) hinzupipettiert. Freies $^{125}J_2$ wird abgetrennt, indem man das Reaktionsgemisch über eine mit Trisacryl GF 05 (LKB) gefüllte Säule gibt. Das Säulenvolumen beträgt 10 ml. PBS (2.11.1) dient als Elutionspuffer. Das radioaktiv markierte Protein wird aufgefangen und im Gammazint (BF 5300, berthold) gemessen und entweder sofort für die Immunfällung eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Immunfällung mit ^{125}J-markierten Proteinen:

Lösungen:

A) 150 mM NaCl
100 mM Na-Phosphat
1 mM EDTA
2,5 % (v/v) Triton X-100
0,2 % (w/v) BSA pH 8,0

B) wie A, ohne BSA

Protein-A-Sepharose CL 4B (Pharmacia) wird in Puffer A suspendiert (5 mg/ml). Für den Testansatz werden 900 µl Protein-A-Sepharose CL 4B, 100 µl Hybridomzellüberstand und 5 µl ^{125}J-markiertes Protein in ein Eppendorfgefäß pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Für die Positivkontrolle wird anstelle von Kulturüberstand 2 µg eines anti-FVIII:vWf Antiköpers und für die Negativkontrolle 2 µg Maus IgG (Sigma) eingesetzt.
In einer Eppendorf-Tischzentrifuge wird die Sepharose sedimentiert, jeweils dreimal mit Puffer A und Puffer B gewaschen und im Gammazint gemessen. Die Proben werden mit je 30 µl Probenpuffer (2.4.1) versetzt und 10 min bei 65 °C erhitzt. Die gefällten Proteine werden in einem SDS-Gradientengel (6-16 %, siehe 2.4.2) aufgetrennt, mit Coomassie (2.4.3) oder Silbernitrat (2.4.4) gefärbt und getrocknet (Geltrockner 224, Bio Rad). Anschließend werden die gefällten, radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie nachgewiesen (Laskey 1984).

Die Autoradiographie der Gele erfolgt durch Exposition eines Röntgenfilmes (Kodak X-Omat AR) bei -70 °C. Zur Verkürzung der Exponierzeit wird eine Verstärkerfolie (CAWO SE 6) benutzt.

2.11.9 Doppeldiffusionstest (Ouchterlony 1949)

Polyklonale Antikörper bilden mit ihrem entsprechenden Antigen am Äquivalenzpunkt ein Präzipitat, welches in Agargelen fixiert bleibt und somit als Präzipitationslinie sichtbar wird.

Auf einer genau waagerecht liegenden Glasplatte wird eine 20 x 10 cm große Agarose-Gel-Fix-Folie (Serva) mit Tesaband befestigt. 1 % (w/v) Agarose, 3 % (w/v) Polyethylenglykol 6000 (in 40 ml PBS) wird im Mikrowellenherd aufgekocht und gleichmäßig auf der Folie verteilt. Nach Erstarren der Agarose werden mit Hilfe einer Schablone 6 Löcher im gleichen Abstand um ein Mittelloch herum ausgestanzt. Der Durchmesser beträgt 2 mm. 5 µl Kaninchenantikörper, die gegen Maus IgG bzw. IgM gerichtet sind, werden in das mittlere Loch pipettiert. Die äußeren Löcher werden mit je 5 µl Probe (10fach konzentrierter Kulturüberstand, Loch 1= unverdünnt, Loch 2-5= 1:2 bis 1:16 Verdünnung in PBS) beschickt. Das Gel wird mindestens 24 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert und 4-6 Stunden in PBS (2.11.1) gewaschen. Auf das gewaschene Gel wird eine Lage Filterpapier, etliche Lagen Kleenex-Tücher, eine Glasplatte sowie ein Gewicht gelegt. Nach 15 min werden die feuchten Tücher gegen trockene ausgetauscht. Das Gel wird mit einem Föhn vollständig getrocknet und kurz in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Mit Entfärbelösung wird solange gewaschen, bis nur noch die Präzipitationslinien angefärbt sind.

2.11.10 Radiale Immundiffusion (Mancini 1965)

Zum Nachweis von Fibrinogen, Fibronectin und FVIII:vWf in den Fraktionen der Immunaffinitätschromatographie (2.7.3) wird der Mancini-Test eingesetzt.

Eine Agarose-Gel-Fix-Folie (Serva) der Größe 8 x 8 cm wird mit Tesaband auf einer Glasplatte befestigt. Die Glasplatte wird auf eine waagerechte Unterlage gelegt. 10 ml PBS + 1 % (w/v) Agarose + 1 % (w/v) Polyethylenglykol 6000 + 0,05 % (v/v) Triton X-100 wird im Mikrowellenherd aufgekocht und in ein 60 °C temperiertes Wasserbad gestellt.

Zur Agarose werden je 250 µl Kaninchenantiserum gegen Fibronectin, Fibrinogen bzw. FVIII:vWf (Behring AG) hinzupipettiert. Die Agarose wird gleichmäßig auf der Folie verteilt. In die erstarrte Agarose werden Löcher mit einem Durchmesser von 4 mm in einem Abstand von 3 cm gestanzt. Jeweils 10 µl der zu testenden Säulenfraktionen werden vorsichtig in die Löcher pipettiert. Protein-Standard-Plasma oder Standard-Human-Plasma (Behring AG) wird mit isotonischer NaCl-Lösung 1:1,5, 1:3, 1:6 und 1:12 verdünnt. 10 µl von jeder Plasmaverdünnung und 10 µl unverdünnter Standard werden in die Probenlöcher gefüllt. In einer feuchten Kammer wird das Gel drei Tage inkubiert und anschließend über Nacht in PBS gewaschen. Das Gel wird getrocknet (siehe Punkt 2.11.9) und mit Coomassie-Lösung angefärbt.

2.11.11 Raketen-Immunelektrophorese (Laurell 1966)

Der einzige prinzipielle Unterschied zum Mancini besteht darin, daß die aufgetragene Probe in einem elektrischen Feld wandert. Die Elektrophorese wird bei pH 8,6 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert sind die Immunglobuline elektrisch neutral und wandern deshalb nicht. Die Diffusion ist gegenüber der Elektrophorese vernachlässigbar gering, so daß kein Präzipitatring, sondern eine "Präzipitatrakete" gebildet wird. Die von der Präzipitatrakete umschlossene Fläche ist proportional zur Menge des aufgetragenen Antigens.

Agaroselösung: 1 % (w/v) Agarose
1 % (w/v) Polyethylenglykol
0,05 % (v/v) Triton X-100
in 20 mM Barbitalpuffer pH 8,6

Die Agarose-Gele werden wie unter Punkt 2.11.10 beschrieben, hergestellt. Bei der Raketen-Immunoelektrophorese wird jedoch nur eine Reihe Löcher in das Gel gestanzt. Der Durchmesser beträgt 2 mm. Der Abstand vom Gelrand und der Abstand der einzelnen Löcher beträgt 2 cm. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer (Flat Bed Apparatus FBE-3000, Pharmazia) gelegt. Die Pufferkammern des Gerätes werden mit Barbitalpuffer (20 mM, pH 8,6) gefüllt. Die Verbindung des Agarosegels zu den beiden Kammern wird durch Filterpapier, das mit Barbitalpuffer getränkt ist, hergestellt. Die Papierbrücken müssen exakt die Breite des Agarosegels besitzen. Nach zügigem Auftragen der Proben (5 µl/Loch) wird eine Spannung von 200 V angelegt. Die Kühltemperatur beträgt ca. 12 °C. Nach der Elektrophorese (ca.5 h) wird das Gel über Nacht in PBS gewaschen. Die Trocknung und Färbung des Gels erfolgt wie in Kap. 2.11.9 beschrieben.

2.12 Isolierung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberstand

2.12.1 Ammoniumsulfatfällung

Nach Jonak (1980) können durch Ammoniumsulfatfällung die Immunglobuline weitgehend von den Albuminen getrennt werden, da bei diesem Aussalzen die schwächer hydratisierten Globuline bereits bei Halbsättigung, die stark hydratisierten Albumine erst bei Ganzsättigung ausfallen.
Die Kulturüberstände der Hybridzellen werden zunächst durch eine Ammoniumsulfatfällung konzentriert. Alle Arbeitsschritte werden bei 4 °C ausgeführt. Der Kulturüberstand wird mit 4000xg 10 min zentrifugiert. Zum Überstand wird eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 7,0, 4°C) unter Rühren zugetropft, bis 50 % Sättigung erreicht ist.

Nach zwei Stunden wird das ausgefällte Protein 30 min bei 13 000xg abzentrifugiert. Das Sediment wird im Verhältnis 1:10 bis 1:20 zum Ausgangsvolumen in PBS aufgenommen und über Nacht gegen PBS dialysiert.

2.12.2 Capronsäurefällung

Mittels Capronsäurefällung können Albumine und andere Fremdproteine ausgefällt werden, während Immunglobuline in Lösung bleiben (Russo et al. 1983).
Ammoniumsulfatgefällte Antikörperlösungen (2.12.2) werden im Verhältnis 1:2 mit 0,06 M Acetatpuffer pH 4,0 verdünnt. Der pH-Wert wird mit 1 N HCl auf pH 4,8 eingestellt. Tropfenweise und unter leichtem Schütteln wird die Capronsäure hinzugefügt (11 µl/ml). Die Lösung wird 30 min bei 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, mit 1 N NaOH auf pH 5,7 eingestellt und über Nacht bei 4 °C gegen Acetatpuffer (0,05 M, pH 5,7) dialysiert.

2.12.3 Chromatographie an Hydroxylapatit

Säulenmaterial	: Hydroxylapatit
Säulenbett	: 1 x 10 cm Volumen: 8 ml
Elutionsmittel	: Linearer Gradient von 0,01 M NaPhosphat (A) bis 0,30 M NaPhosphat pH 6,8
Elutionsgeschwindigkeit	: 30 ml/h
Fraktionsgröße	: 1 ml

Durch Ammoniumsulfatfällung (2.12.1) und anschließender Capronsäurefällung angereicherte Antikörperlösungen werden mit einer Pumpgeschwindigkeit von 15 ml/h auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer A werden die Proteine mit einem Phosphat-Gradienten (s.o.) eluiert. Das Eluat wird bei OD_{280} im Durchflußphotometer gemessen und auf einem Schreiber dokumentiert.

2.12.4 DEAE-Ionenaustauscherchromatographie

Lösungen: 0,015 M NaH_2PO_4 pH 6,3 (A)
0,1 M NaH_2PO_4 pH 6,8 (B)

Säule : ZetaPrep-15 DEAE Disk (AMF)

Das Säulenmaterial wird zuerst mit 75 ml Puffer B , danach mit gleichem Volumen Puffer A äquilibriert.
Mit Puffer A verdünnter Kulturüberstand (1:10) wird mit einer Pumpgeschwindigkeit von 30 ml/h auf die Säule aufgetragen. Das Säulenmaterial wird mit Puffer A gewaschen bis die OD_{280} vernachlässigbar gering ist. Gebundene Proteine werden mit Puffer B eluiert (180ml/h).

2.12.5 Protein-A-Affinitätschromatographie

Säulenmaterial: Protein-A-Sepharose CL 4B (Pharmacia)
Säulenbett : 1 x 5 cm Volumen: 4 ml
Puffer : MAPS- Puffer (Monoclonal Antibody Purification System)
- Bindungspuffer
- Elutionspuffer
- Regenerationspuffer

1,5 g Protein-A-Sepharose wird in ca. 20 ml PBS vorgequollen, in eine Säule gefüllt und mit 25 ml MAPS-Bindungspuffer (Bio Rad) äquilibriert. Die maximale Bindungskapazität der Säule beträgt 100-120 mg Antikörper. Die ammoniumsulfatgefällte Probe (2.12.1) wird im Verhältnis 1:1 mit Bindungspuffer verdünnt und mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 ml/min aufgetragen. Die Säule wird mit 75 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Antikörper werden mit Elutionspuffer bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert. Es werden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die antikörperhaltigen Fraktionen werden vereinigt, neutralisiert und gegen PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die Antikörperkonzentration wird mit dem ELISA (2.11.3) bestimmt.

2.13 Darstellung von Immunaffinitätssäulen

2.13.1 Antikörperkopplung an CNBr-aktivierte Sepharose

CNBr-Aktivierung (Hoppe 1976):

20 g Sepharose 2B werden in einer Glasfritte mit ca. 500 ml H_2O-dest. gewaschen , in 16 ml H_2O-dest. aufgenommen und zu 32 ml 2 M Natriumcarbonatpuffer (pH 11,5) gegeben. Das Gel wird unter schnellem Rühren mit 7 g CNBr in 7 ml Acetonitril versetzt. Nach 4 min wird die Drehzahl des Rührers etwas verringert. Die Reaktionsdauer beträgt 10 min. Danach wird das Gel mit 200 ml kaltem $NaHCO_3$-Puffer (0,2 M, pH 9,0) gewaschen. Die CNBr-Aktivierung wird unter dem Abzug durchgeführt. Vor der Umsetzung mit Liganden wird das aktivierte Gel in 20 ml kaltem $NaHCO_3$-Puffer (s.o.) suspendiert.

Kopplung von Immunglobulinen an CNBr-aktivierte Sepharose:
10 ml affinitätsgereinigte Antikörperlösung (1 mg/ml) werden zu der aktivierten Sepharose gegeben auf einem Überkopfschüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Proteingehalt des Überstandes wird vor und nach der Kopplung bestimmt. Das Gel wird mit 0,2 M $NaHCO_3$-Puffer (pH 9,0) gewaschen und mit 1 M Ethanolamin pH 9,0 zwei Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wird die Sepharose 3x mit jeweils 200 ml folgender Lösungen gewaschen:

1) 0,1 M NaOAc, 0,5 M NaCl pH 4,0
2) 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl pH 8,0

Das Gel wird in Imidazolpuffer + 0,02 % (w/v) NaN_3 bei 4 °C aufbewahrt.

2.13.2 Antikörperkopplung an Aminohexyl-substituierten Säulenmaterialien mittels Carbodiimid

Folgende Trägermaterialien werden für die Kopplung verwendet:
1) Aminohexyl-Eupergit
2) Aminohexyl-SP 500
3) Aminohexyl-Sepharose
und nach der Vorschrift von Dr. Bückmann (GBF, Abt. Enzymtechnologie) mit Antikörper inkubiert.
Für die Kopplung werden je 2 g der obengenannten Säulenmaterialien, 3,2 mg Antikörper und 50 mg Carbodiimid eingesetzt. Die Säulenmaterialien werden in Na-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5) + 1 % (w/v) NaCl suspendiert. Antikörper und Carbodiimid werden zugesetzt und durch leichtes Schwenken gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 4 °C wird der Proteingehalt des Überstandes bestimmt. Die Gele werden mit 200 ml 1 % (w/v) NaCl gewaschen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Gelelektrophoretische und immunchemische Untersuchungen mit kommerziellen FVIII-Präparaten

Kommerzielle FVIII-Präparate werden meist mittels Ethanolfällung aus Plasma gewonnen (Cohn Fraktion I, Kryopräzipitat). Durch Extraktion mit Tris-Puffer und durch Kältepräzipitation werden die Plasmaproteine Fibrinogen und Fibronectin, und durch $Al(OH)_3$-Adsorption die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X entfernt (Newman et al. 1971, Johnson et al. 1984).

Verschiedene kommerzielle FVIII-Präparate werden gelelektrophoretisch - SDS-PAGE und Agargelelektrophorese - und immunochemisch auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mehrere kommerzielle FVIII-Präparate werden durch SDS-PAGE charakterisiert. Abbildung 6 zeigt die in einem 6-16%igen Gradientengel aufgetrennten und nach der Silbernitratmethode angefärbten Proteine.

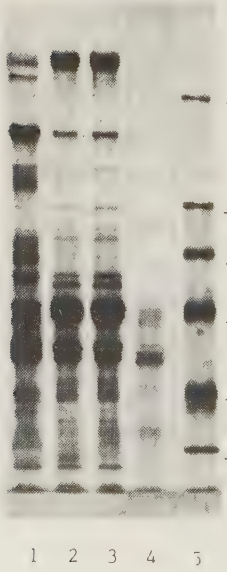
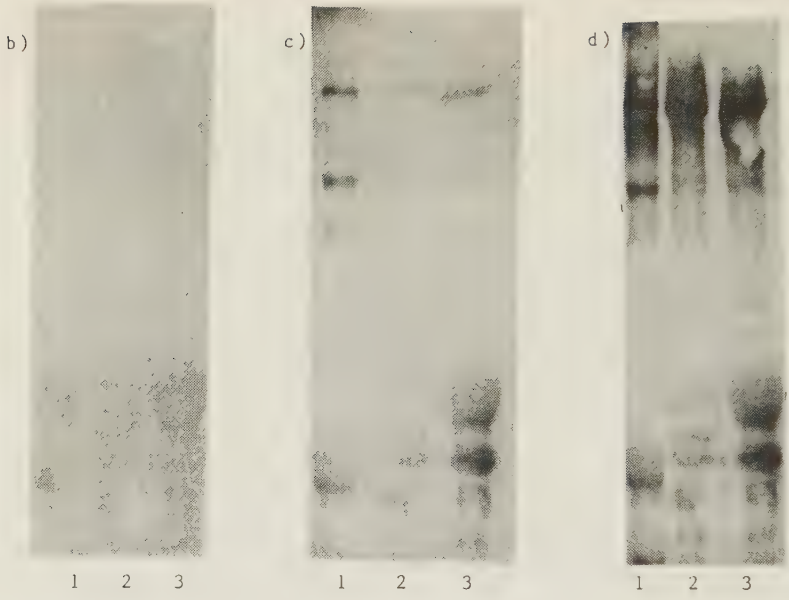


Abb.6: SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (6-16%) mit FVIII-Präparaten 3 µg/Schacht
1= Antihämophiles Globulin A vom DRK-Blutspendedienst
2= Antihämophiler Fakor von Medac
3= Actif VIII von Rhone-Poulenc
4= Fibrinogen
5= Eichproteine

Die Proben werden vor der Elektrophorese mit 2% Mercaptoethanol reduziert. Zur Bestimmung der Molekulargewichte einzelner Proteinbanden werden die R_f-Werte der Eichproteine gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen.
Bei allen FVIII-Präparaten erkennt man eine Vielzahl von Proteinbanden, die im Molekulargewichtsbereich von 25 000 bis 300 000 liegen. Die FVIII-Präparate der Firmen Medac und Rhone-Poulenc (Institut Bio Merieux) weisen in etwa das gleiche Bandenmuster auf. Das FVIII-Präparat des DRK-Blutspendedienstes unterscheidet sich von den anderen Präparaten vor allen Dingen durch den höheren Anteil eines Proteins mit dem Molekulargewicht von ca. 160 000 und der schwächeren Intensität einer Proteinbande von ca. 240 000. Es wird angenommen, daß diese Proteinbande die Untereinheiten des FVIII:vWf repräsentiert. Über das Molekulargewicht dieser Untereinheiten werden in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht: 200 000 (Rock et al. 1978), 210 000 (Thorell und Blombäck 1978), 220 000 (Ginsburg et al. 1985), 225 000 (Hoyer 1981), 260 000 (Legaz et al. 1973, Counts et al. 1978, Sadler et al. 1985), 270 000 (Titani et al. 1986, Chopek et al. 1986). Die in allen Präparaten stark vertretenen Proteinbanden, die im Molekulargewichtsbereich von 45-70 kD liegen, könnten die Untereinheiten des Plasmaproteins Fibrinogen darstellen (Literaturwert: 47 600, 56 000, 67 000).

Die Identität der Fibrinogen-, FVIII:vWf- und Fibronectinbanden wird durch Immunoblotting bestätigt. Die FVIII-Präparate werden einer SDS-PAGE unterworfen, die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf Nitrozellulosefolie übertragen und die Folie mit polyklonalen Antikörpern gegen Fibrinogen, FVIII:vWf bzw. Fibronectin inkubiert. Gebundene Antikörper werden durch sekundäre enzymgekoppelte Antikörper nachgewiesen.
Die Immunfärbung der einzelnen Proteine ist in Abbildung 7 wiedergegeben.



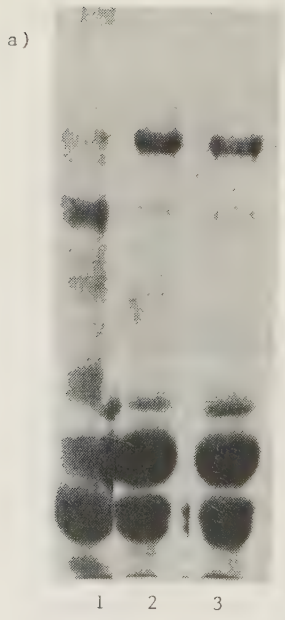


Abb. 7: Immunfärbung der im SDS-Gel aufgetrennten und auf Nitrozellulose transferierten FVIII-Präparate des DRK (1), der Firma Medac (2), und Rhone-Poulenc(3).

a) Amido-Schwarz gefärbte Nitrozellulosefolie

Die Nitrozellulose wird sukzessiv mit Antiserum gegen Fibrinogen (b), FVIII:vWf (c) und Fibronectin (d) inkubiert (2.13.5)

Abbildung 7 b) zeigt die Immunfärbung nach Inkubation mit Antiserum gegen Fibrinogen. Das zunächst sehr schwach angefärbte Fibrinogen tritt aufgrund der längeren Einwirkungszeit des sekundären Antikörpers in Abb.7 c) und d) stärker hervor.
Nach Inkubation mit Antiserum gegen FVIII:vWf (c) erscheinen neben der 240 000 D Bande zwei weitere Banden, die einem Molekulargewicht von 160 000 und 140 000 D entsprechen. Diese Proteinbanden, die im FVIII-Präparat vom DRK verstärkt auftreten, stellen vermutlich Abbauprodukte des FVIII:vWf dar.
Eine verstärkte Färbung im Molekulargewichtsbereich von 230 000 - 270 000 tritt nach der Inkubation mit Antiserum gegen Fibronectin auf. Nach Hynes (1986) beträgt das Molekulargewicht der Fibronectin Untereinheiten 250 000 D.

Agargelelektrophorese

Die Heterogenität der FVIII-Präparate wird besonders deutlich, wenn die Proteine in einem Agarose-Gel unter nicht denaturierenden und nicht reduzierenden Bedingungen getrennt werden (Abb. 8). Bei den FVIII-Präparaten von Medac und Rhone-Poulenc werden fünf mehr oder weniger stark angefärbte Banden sichtbar. Beim FVIII-Präparat vom DRK treten mehrere diffuse, weniger stark gefärbte Banden auf.

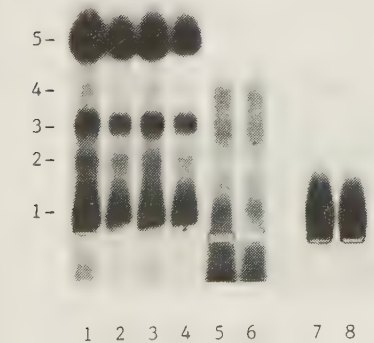


Abb. 8: Agarose-Gel (1 %)
1, 2 FVIII der Fa. Rhone-Poulenc
3, 4 FVIII der Fa. Medac
5, 6 FVIII vom DRK
7, 8 Fibrinogen
je 500 bzw. 250 µg
Durchführung siehe Kapitel 2.4.5

Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose und anschließender Immunfärbung mit polyklonalen Antiseren (siehe Abb. 9), können die Proteinbanden 1 und 3 den Plasmaproteinen Fibrinogen (Bande 1), Fibronectin und FVIII:vWf (Bande 3) zugeordnet werden. Die Bande 5 entspricht humanem Serumalbumin (HSA).

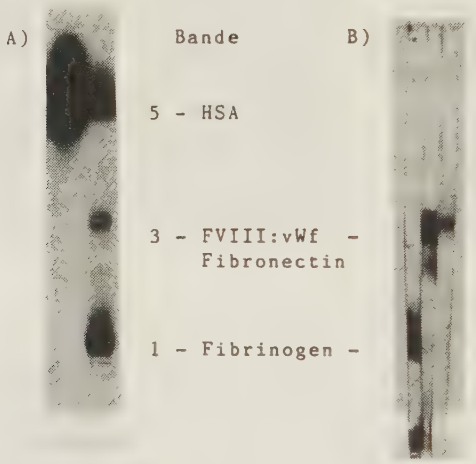


Abb. 9: A) Agarose-Gel
Spur 1: HSA
Spur 2: FVIII-Präparat (Rhone-Poulenc) 250 µg
B) Immunfärbung der im Agarose-Gel aufgetrennten und auf Nitrozellulose transferierten Proteine des FVIII-Präparats (Rhone Poulenc) mit Antiseren, die gegen Fibrinogen (a), Fibronectin (b) und FVIII:vWf (c) gerichtet sind.

3.2 Anreicherung des FVIII-Komplexes aus kommerziellen FVIII-Präparaten

Die gelelektrophoretischen und immunchemischen Untersuchungen zeigen die mehr oder weniger starken Verunreinigungen der FVIII-Präparate durch Fibrinogen, Fibronectin und Serumalbumin auf.
Verschiedene Methoden der Proteinfällung und verschiedene Chromatographiemethoden werden zu einer Anreicherung des FVIII-Komplexes getestet.

3.2.1 Proteinfällungen mit PEG 6000 und Brij 35

In Tris-HCl Puffer gelöste FVIII-Präparate werden mit PEG 6000 (0,5-5 %) bzw. Brij 35 (0,1-5 %) versetzt und 12 Stunden bei 4 °C inkubiert (Durchführung siehe 2.6.1). Die gefällten Proteine werden in 100 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) gelöst. Nach Ermittlung des Proteingehalts und der Gerinnungsaktivitäten werden die Proben in einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach der Silbermethode angefärbt.
Es kann kein Unterschied im Proteinmuster des Ausgangspräparates und der gefällten Proben festgestellt werden.
In Tab. 3 sind die Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten bei den Fällungen wiedergegeben.
Aufgrund der hohen Aktivitätsverluste und der niedrigen Reinigungsfaktoren sind die durchgeführten Fällungen für die Isolierung von FVIII ungeeignet.

PEG 6000	FVIII:C Aktivität		Aus-beute	Brij 35	FVIII:C Aktivität		Aus-beute
%	E/ml	E/mg	%	%	E/ml	E/mg	%
0	26	0,34	100	0	26	0,34	100
0,5	8,6	0,69	33	0,1	2,6	0,54	10
1,0	12,4	0,45	48	0,2	2,6	0,53	10
1,5	15,2	0,48	58	0,4	2,9	0,74	11
2,0	12,6	0,34	48	0,8	3,4	0,39	13
3,5	12,2	0,34	46	0,9	6,4	0,28	25
5,0	11,4	0,27	44	1,0	5,4	0,29	21
				5,0	1,3	0,06	5

Tab. 3: Proteinfällung mit PEG 6000 und Brij 35.
FVIII-Präparat=Actif VIII,
Durchführung siehe 2.6.1

3.2.2 Chromatographie mit Galactosamin-Agarose und Arginin-Sepharose 4B

Mit Hilfe eines Haemagglutinationstests mit Formaldehyd-fixierten Schaf-Erythrozyten stellten Booth et al. (1984) eine starke Lectinaktivität des FVIII:vWf fest. Diese Aktivität konnte durch positiv geladene Aminosäuren (u.a. Arginin) und durch Galactosamin inhibiert werden.

Mit folgendem Versuch soll ermittelt werden, ob der FVIII-Komplex an immobilisiertem Galactosamin bzw. Arginin bindet, und somit aus den verunreinigten FVIII-Präparaten isoliert werden kann. Für die Reinigung werden die im Handel erhältlichen Säulenmaterialien Galactosamin-Agarose und Arginin-Sepharose 4B eingesetzt.

Die lyophylisierten FVIII-Präparate werden in 5 ml Tris-HCl Puffer (pH 7,4) gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen des Säulenmaterials mit oben genanntem Puffer, erfolgt die Elution gebundener Proteine mit 200 mM Galactosamin bzw. Arginin.

Wie aus dem Elutionsprofil in Abb. 10 hervorgeht, ist die Galactosamin-Agarose zur FVIII-Anreicherung ungeeignet, da der FVIII-Komplex nicht bzw. nur sehr schwach gebunden wird. Über 90 % der Aktivität befinden sich im Durchlauf (Peak 1).

Die mit Arginin-Sepharose durchgeführte Chromatographie bringt ebenfalls keine Anreicherung des FVIII-Komplexes.

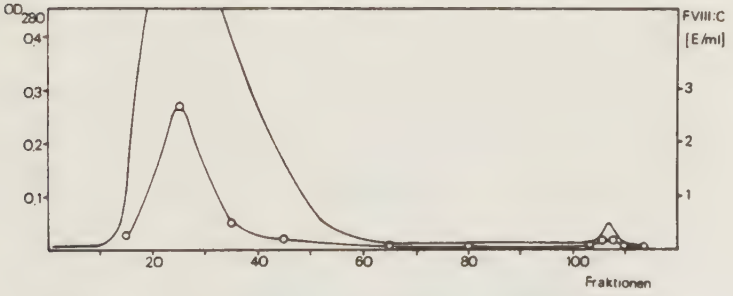


Abb. 10: Elutionsprofil der Chromatographie an Galactosamin-Agarose
Durchführung siehe Abschnitt 2.6.5
FVIII:C o—o OD_{280} ——

3.2.3 Ionenaustauscherchromatographie

Zur Anreicherung des FVIII-Komplexes werden die Anionenaustauschermaterialien QAE-Cellulose und Trisacryl-M-DEAE eingesetzt. Als Elutionsmittel wird ein kationischer Puffer (50 mM Imidazol, pH 7,0) gewählt.
Für die Chromatographie an QAE-Cellulose wird 50 mg FVIII-Konzentrat in 5 ml Imidazolpuffer gelöst und auf das Säulenmaterial aufgetragen. Nach der Elution ungebundener Proteine wird ein kontinuierlicher NaCl-Gradient (100-500 mM) angelegt. Die Fraktionen werden auf FVIII-Aktivität getestet. Wie in Abbildung 11 zu sehen, bindet der FVIII-Komplex an QAE-Cellulose (im Durchlauf keine Aktivität nachweisbar) und wird bei ca. 0,2 M NaCl eluiert.

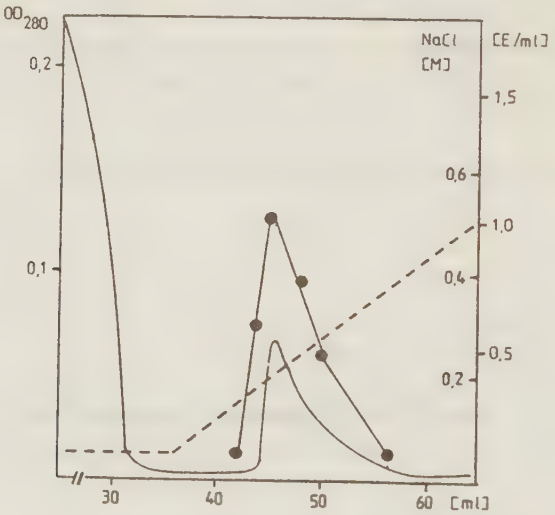


Abb. 11: Elutionsprofil der Chromatographie an QAE-Cellulose
OD_{280} ——— FVIII:C-Aktivität •——•
Gradient ----- Durchführung siehe 2.6.4

Für die Beurteilung der Ausbeute und des Reinigungsgrades werden die aktiven Fraktionen vereinigt. Volumen, Proteingehalt und Aktivität der vereinigten Fraktionen werden bestimmt. Die ermittelten Daten sind in Tabelle 4 aufgeführt. Mit Hilfe der QAE-Cellulose kann eine 5,6fache Anreicherung erzielt werden. Die Chromatographie führt allerdings zu sehr hohen Aktivitätsverlusten.

Tab. 4: Bilanz der FVIII-Anreicherung durch Chromatographie an QAE-Cellulose mit Actif VIII, Durchführung siehe 2.6.4

	Gesamt-protein mg	Gesamt-aktivität E	spezif. Aktivität E/mg	Reinigungs-faktor	Ausbeute %
vor QAE	20	18	0,9	1	100
nach QAE	0,9	4,5	5,0	5,6	25

Die Chromatographie an Trisacryl-M-DEAE wird mit 150 mg FVIII-Präparat (in 5 ml Imidazol-Puffer) durchgeführt. Das Säulenvolumen beträgt 20 ml. Die Elution gebundener Proteine erfolgt mit einem Stufengradienten (100, 150, 400 mM NaCl). Gebundener FVIII kann mit 400 mM NaCl eluiert werden (siehe Abb. 12). Die erzielte Ausbeute und der Grad der Anreicherung ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

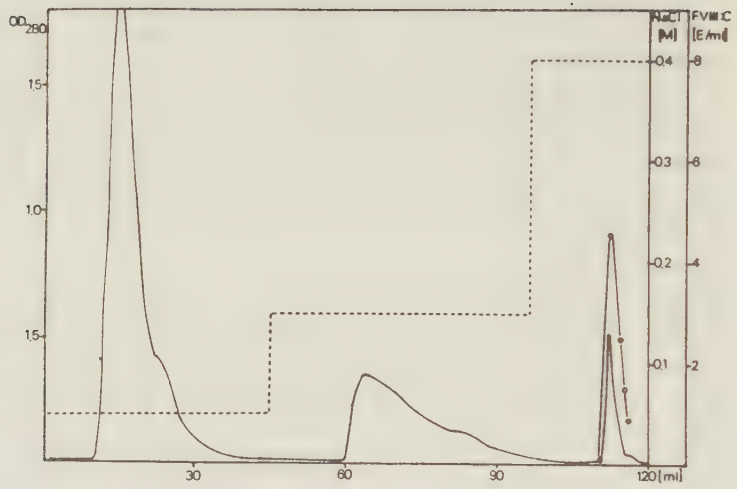


Abb. 12: Elutionsprofil der Chromatographie an Trisacryl-M-DEAE

OD_{280} ——— FVIII:C-Aktivität o——o

Gradient------ Durchführung siehe 2.6.3

Tab. 4: Bilanz der FVIII-Anreicherung durch Chromatographie an Trisacryl-M-DEAE mit Actif VIII, Durchführung siehe 2.6.3

	Gesamt-protein mg	Gesamt-aktivität E	spezif. Aktivität E/mg	Reinigungs-faktor	Ausbeute %
vor Trisacryl	55	27	0,49	1	100
nach Trisacryl	1,9	13	7,03	14	48

Durch Chromatographie an Trisacryl-M-DEAE angereicherter FVIII weist eine spezifische Aktivität von 7 E/mg Protein auf. Es wird ein Reinigungsfaktor von 14 ermittelt. Beim mehrmaligen Wiederholen dieses Reinigungsschrittes werden starke Schwankungen bei der spezifischen Aktivität des Ausgangsmaterials festgestellt. Die gemessenen Werte liegen zwischen 0,2 und 0,9 E pro mg Protein.
Die in den Tabellen aufgeführten Daten werden mit dem FVIII-Präparat Actif VIII erzielt. Beim FVIII-Präparat vom DRK beträgt die spezifische Aktivität der angereicherten Präparation 2,6 E/mg Protein. Aus Kosten und Zeitgründen werden weitere Versuche nicht mehr mit allen drei FVIII-Präparaten, sondern nur mit Actif VIII durchgeführt.

3.2.4 Gelfiltration

Da bei der Ionenaustauscherchromatographie hohe Aktivitätsverluste auftreten und die Reinigungsfaktoren relativ niedrig sind, soll eine Anreicherung des FVIII-Komplexes mit Hilfe der Gelfiltration durchgeführt werden. Durch die Wahl eines geeigneten Säulenmaterials könnte FVIII aufgrund seiner enormen Größe im Ausschlußvolumen eluiert und somit von kontaminierenden Proteinen getrennt werden.
Da die Literaturangaben über das Molekulargewicht des FVIII-Komplexes stark voneinander abweichen (2-20 Mio), werden mehrere Säulenmaterialien mit unterschiedlichen Ausschlußgrenzen getestet:

	Ausschlußgrenze
ACA 22	22 x 10^6
Sepharose CL 4B	20 x 10^6
Sephacryl 400	9 x 10^6
Sepharose CL 6B	4 x 10^6
Biogel A 1,5 m	1,5 x 10^6
Sephacryl 300	1 x 10^6

Die Chromatographie erfolgt mit einer Säule mit den Abmessungen 1,6 x 100 cm (200 ml Bettvolumen). Es werden 200 mg FVIII-Konzentrat in 2 ml Imidazolpuffer aufgetragen. Die Durchführung der Chromatographie erfolgt wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben.
Sepharose CL 6B zeichnet sich aufgrund des besseren Trennergebnisses (Hauptaktivität im Auschlußvolumen) gegenüber den anderen Säulenmaterialien aus, und wird zur Anreicherung größerer Mengen im präparativen Maßstab (ca. 2 l Säulenvolumen, Probenvolumen: 2 g FVIII/ 20 ml) eingesetzt. Abbildung 13 zeigt das Elutionsprofil der Gelfiltration mit Sepharose CL 6B und den Verlauf der FVIII:C Aktivität. Fraktionen mit hoher Aktivität werden vereinigt. Die Gesamtaktivität wird bestimmt. Der Nachweis von FVIII:vWf in den angereicherten Proben erfolgt mit Hilfe der Raketen-Immunelektrophorese (Durchführung siehe 2.11.11).

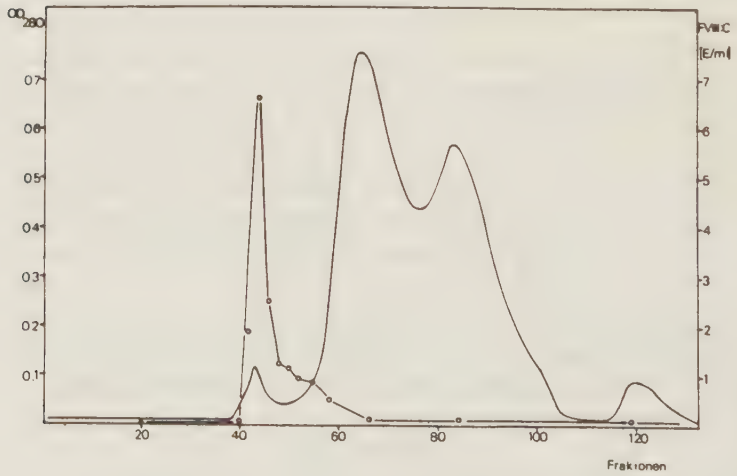


Abb. 13: Elutionsprofil der Gelfiltration an Sepharose CL 6B
OD_{280} ——— ,FVIII:C-Aktivität o——o
Durchführung siehe 2.6.2

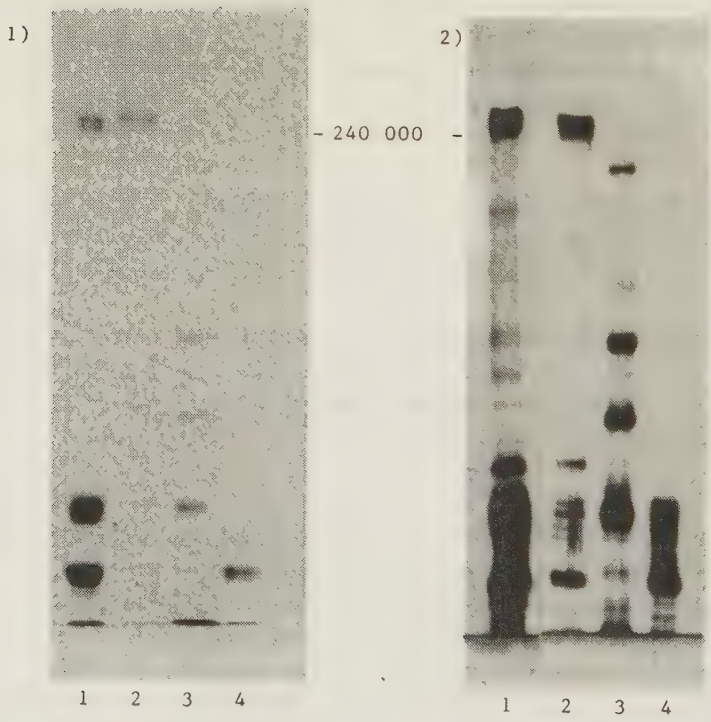
Erfolgt die Chromatographie mit Barbitalpuffer, so liegt die Aktivitätsausbeute bei 38 %; auch Zusatz von 3,5 % (w/v) Dextran T40 führt zu keiner erhöhten Ausbeute. Mit Citratpuffer als Elutionsmittel kann eine 108fache Anreicherung und eine Ausbeute von 95 % erreicht werden. Die spezifische Aktivität der angereichten Präparation beträgt 55 E/mg Protein (siehe Tab. 6).

	Gesamt-protein mg	Gesamt-aktivität E	spezif. Aktivität E/mg	Reinigungs-faktor	Ausbeute %
vor Seph.	1200	608	0,5	1	100
nach Seph.	10,5	580	55,2	108	95

Tab. 6: FVIII-Anreicherung durch Gelfiltration mit Sepharose CL 6B , mit Actif VIII Citratpuffer als Elutionsmittel Durchführung siehe 2.6.2

Abbildung 14 zeigt die in einem 6 %igen SDS-Gel aufgetrennten, reduzierten FVIII-Proben vor (Spur 4) und nach (Spur 1) der Gelfiltration. Die obere stark gefärbte Bande (240 000 D) repräsentiert die Untereinheiten des FVIII:vWf. Die angereicherte FVIII-Präparation zeigt noch geringe Verunreinigungen durch Fibrinogen.

Abb. 14: 6 %iges SDS-Gel
Coomassie (1) Silberfärbung (2),
2 µg Protein/Schacht
Spur 1: Actif VIII
Spur 2: angereicherte FVIII-Präparation
Spur 3: HMW Standard
205 000, 116 000,
97 400, 66 000,
45 000, 29 000
Spur 4: Fibrinogen



Thrombinaktivierbarkeit der angereicherten FVIII-Präparation

Wie in der Einleitung dargestellt (Abb.1), wird FVIII:C durch die Serinprotease Thrombin aktiviert. Durch Zugabe von Thrombin (0,1 E Thrombin auf 1 E FVIIIC) zu den angereicherten Proben erfolgt eine 3fache Aktivierung von FVIII:C. Abbildung 15 zeigt die Thrombinaktivierung von FVIII:C über einen Zeitraum von 45 min. Zehn Minuten nach der Zugabe von Thrombin ist das Aktivitätsmaximum erreicht. Danach sinkt die Aktivität innerhalb von 35 Minuten unter den Ausgangswert ab.

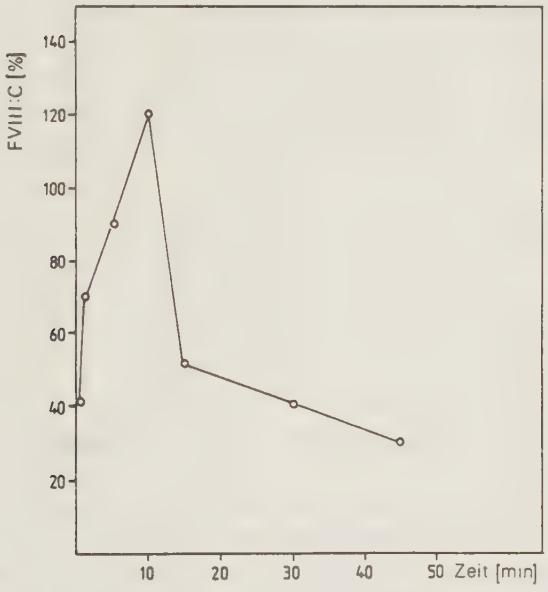


Abb. 15: Zeitabhängige Aktivierung von FVIII:C mittels Thrombin (Durchführung siehe 2.5.1)

3.2.5 Anreicherung des FVIII-Komplexes durch Chromatographie an Sepharose CL 6B und Trisacryl-M-DEAE

Die mit Hilfe der Gelfiltration angereicherte FVIII-Präparation wird mit Imidazolpuffer soweit verdünnt, daß die NaCl-Konzentration der Probe 45 mM beträgt. Die Probe wird mit einer Pumpgeschwindigkeit von 30 ml pro Stunde auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben mit 400 mM NaCl.
In Tabelle 7 ist die Bilanz der Anreicherung und der Ausbeute beider Reinigungsschritte wiedergegeben.

	Gesamt-protein	Gesamt-aktivität	spezif. Aktivität	Reinigungs-faktor	Ausbeute
	mg	E	E/mg		%
Actif VIII	1200	608	0,5	1	100
Sepharose	10,5	580	55,2	108	95
Trisacryl	3,2	65	20,2	-	11

Tab. 7: Bilanz der FVIII-Anreicherung durch Chromatograhie an Sepharose CL 6B und Trisacryl-M-DEAE

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, kann durch Trisacryl-M-DEAE keine weitere Reinigung erzielt werden.
Versuche mit anderen Ionenaustauschermaterialien (QAE-Sephadex, DEAE-Sephacel, SP-Sephadex, Servacel SE 80) liefern ähnliche Ergebnisse. Deshalb wird der mit Hilfe der Gelfiltration an Sepharose CL 6B angereicherte FVIII für die Immunisierung der Mäuse eingesetzt. Die Präparation wird durch 40 %ige Ammoniumsulfatfällung konzentriert (Ausbeute ca. 50 %) und bei -70 °C gelagert.

3.3 Spaltung des FVIII-Komplexes

Für die in dieser Arbeit angestrebte immunaffinitätschromatographische Reinigung von FVIII:C aus humanem Plasma muß eine geeignete Methode zur Spaltung des FVIII-Komplexes gefunden werden.
Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, daß der Komplex bei hoher Ionenstärke in FVIII:vWf und FVIII:C dissoziert (Owen und Wagner 1972, Rick und Hoyer 1973, Weiss und Hoyer 1973).
200 mg FVIII-Konzentrat wird in 2 ml Imidazolpuffer, der je nach Versuchsansatz 1 M NaCl, 1 M $LiCl_2$ oder 0,255 M $CaCl_2$ enthält, gelöst und 30 min bei 37 °C inkubiert. Um zu prüfen, ob die eingesetzten Salze eine Dissoziation des FVIII-Komplexes bewirken, werden die Proben mit Hilfe der Gelfiltration an Sepharose CL 6B getrennt. Dem Elutionspuffer (20 mM Imidazol, pH 7,35) werden die entsprechenden Salze zugesetzt.

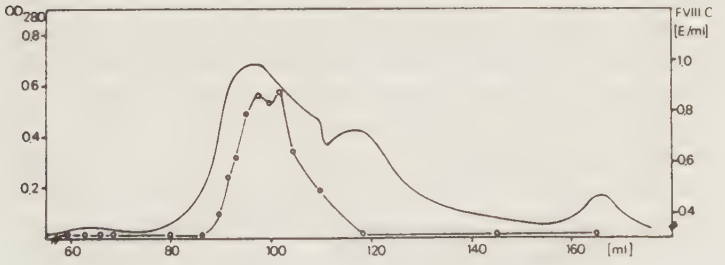


Abb. 16: Elutionsprofil einer Chromatographie an Sepharose CL 6B nach Dissoziation des FVIII-Komplexes durch 255 mM $CaCl_2$
OD_{280} ——— ,FVIII:C-Aktivität o——o
Durchführung siehe 2.7.1

Abbildung 16 zeigt das Elutionsprofil der Chromatographie an Sepharose CL 6B nach Spaltung der Probe mit 255 mM $CaCl_2$. Die Aktivität eluiert mit der Hauptproteinmenge in den Fraktionen 90-120 und nicht wie in Abbildung 13 zu sehen, im Ausschlußvolumen der Säule. Das Elutionsprofil zeigt, daß eine vollständige Dissoziation des FVIII-Komplexes stattgefunden hat. Durch 1 M NaCl bzw. 1 M $LiCl_2$ kann keine vollständige Spaltung des Komplexes erzielt werden. Ein großer Teil der Aktivität eluiert nach wie vor im Ausschlußvolumen. Bei der Immunaffinitätschromatographie (Kap. 3.6.2) wird deshalb 255 mM $CaCl_2$ zur Spaltung von FVIII eingesetzt.

3.4 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Bestandteile von FVIII-Präparaten

Da die Versuche den FVIII-Komplex mit Hilfe von Proteinfällungen und den verschiedensten Säulenchromatographien nur begrenzten Erfolg hatten, wird als weiterer Weg eine Immunaffinitätschromatographie gewählt. Für die Herstellung der Immunaffinitätssäulen müssen zunächst anti-FVIII:vWf Antikörper isoliert werden.

3.4.1 Immunisierung und Fusion

Weibliche Balb/c Mäuse werden durch mehrmalige subcutane bzw. intraperitoneale Injektion von 150 µg angereichertem FVIII (Sepharose CL 6B, siehe 3.2.4) immunisiert. Zur Steigerung der Immunantwort und Verringerung des Antigenbedarfs werden Adjuvantien (FAI, FAC) eingesetzt. Diese wirken über eine Verzögerung der Antigenfreisetzung aus den durch Injektion entstandenen Depots (Freund und McDermont 1942).

Nach Dietzgen (1983) und Stähli et al. (1980, 1983) ist die Häufigkeit der Antikörper-produzierenden Hybridome direkt mit dem Anteil Antikörper-produzierender B-Lymphozyten in der Milz korreliert. Deshalb wird die Maus mit der stärksten Immunantwort für die Fusion ausgewählt.Die Bestimmung des Antikörpertiters im Serum immunisierter Mäuse erfolgt mit Hilfe des ELISA (siehe Kap. 2.10.2).
Neben Fusionen mit in vivo immunisierten Milzzellen (7 Fusionen) wird eine Fusion mit in vitro immunisierten Milzzellen durchgeführt (siehe 2.10.3). Vorteile der in vitro Immunisierung sind kürzere Immunisierungszeit und geringer Antigenbedarf (80 µg FVIII statt 900 µg).

Da die Milzzellen in Kultur nicht überlebensfähig sind, werden sie mit Maus Myelomzellen (NSI, Ag8, NSO) fusioniert (2.10.5). Die Myelomzellen müssen sich zum Zeitpunkt der Fusion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (Galfre, Milstein 1981). Nach der Fusion wird durch eine chemische Selektion (HAT-Selektionsmethode, Littlefield 1964) das Weiterleben der nichtfusionierten Myelomzellen verhindert. Die für die Fusion verwendeten Myelomzellen sind Mutanten, die einem Defekt im Nukleinsäurestoffwechsel aufweisen. Ihnen fehlt das für den Reservestoffwechselweg der Nukleinsäuresynthese notwendige Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase). Durch Zugabe von Aminopterin zum Kulturmedium wird der Hauptstoffwechselweg für die Nukleinsäuresynthese blockiert und die nichtfusionierten Myelomzellen sterben ab. Da die Milzzellen das Enzym HGPRT besitzen, können die Hybridzellen die im Selektionsmedium enthaltenen Vorstufen des Reservestoffwechelweges (Hypoxanthin und Thymidin) nutzen.

Die Hybridzellen werden zwei Wochen im HAT-(Hypoxanthin Aminopterin, Thymidin) Selektionsmedium, danach in HT-Medium kultiviert.

Nach ca. einer Woche sind die ersten Hybridklone zu erkennen (siehe Abb. 17). Die Zellen werden nachgefüttert und mit einer Pipette leicht aufgewirbelt.

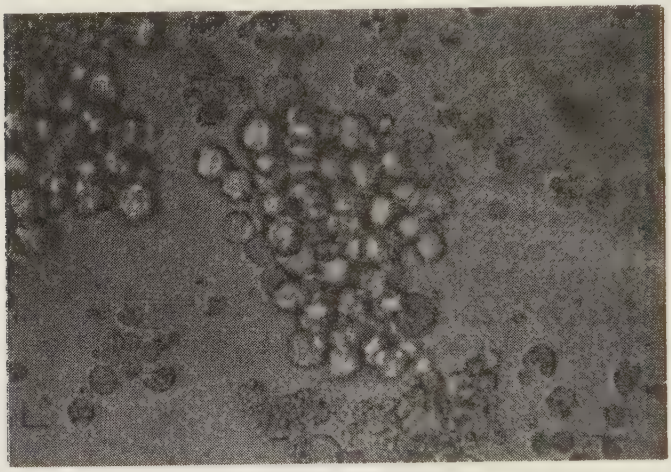


Abb. 17: Anwachsender Hybridklon nach der Fusion
Vergrößerung 200x

Etwa zwei Wochen nach der Fusion werden die Zellkulturüberstände mit Hilfe des ELISA auf ihren Antiköpergehalt hin untersucht.

In Tabelle 8 ist die Klonausbeute der durchgeführten Fusionen und der Anteil der Antikörper-produzierenden Klone dargestellt.

Fusion Nr.	Myelom-zellen	Anzahl Klone	Ig-sezernierende Klone	
			Anzahl	% aller Klone
I	Ag8	91	65	71
II	Ag8	148	104	70
III	NSI	120	25	21
IV	NSO	16	4	25
V	NSI	223	184	83
VI	NSI	198	79	40
VII	NSI	360	155	43
VIII	NSI	87	n.b.	-

Tab. 8: Ausbeute an IgG und IgM produzierenden Klonen
Anzahl Klone= Anzahl der Mikrotiterlöcher mit wachsenden Hybridzellen
Fusionen nach in-vivo Immunisierung= I-VII
in-vitro Immunisierung= Fusion VIII
n.b.- nicht bestimmt, diese Fusion wurde direkt auf antigenspezifische Ig-Produktion getesetet

Die höchste Fusionsrate wird mit der Myelomzellinie NSI bei der Fusion Nr. VII erzielt, bei der weitgehend alle Löcher der Mikrotiterplatten mit wachsenden Hybridklonen besetzt sind. Die niedrigste Fusionsrate zeigt sich bei der Fusion Nr. IV mit der Myelomzellinie NSO, bei der nur 16 Hybridklone anwachsen.

Antigenspezifität der Hybridklone

Positive Hybridklone werden auf antigenspezifische Antikörperproduktion getestet. Da für die Immunisierung kein reines Antigen zur Verfügung stand, sind auch Hybridome zu erwarten, die Antikörper gegen andere Bestandteile des Präparates sezernieren. Mit Hilfe des direkten ELISA (siehe 2.11.2) werden die Überstände auf anti-Fibrinogen und anti-Fibronectin Antikörper hin untersucht.

Anti-FVIII:vWf Antikörper werden durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit Endothelialzellen (siehe 3.5.2) ermittelt. Die Antigenspezifität dieser Antikörper wird durch Immunfällung mit ^{125}J-markiertem FVIII (3.5.3) und durch Immunoblot (3.5.4) bestätigt.

Tabelle 9 zeigt, daß nur ein geringer Prozentsatz der Immunglobulin-produzierenden Klone Antikörper gegen FVIII:vWf bilden.

Die aus der Fusion von NSI Myelomzellen mit in-vitro immunisierten Milzzellen hervorgegangen Hybridklone produzieren keine spezifisch gegen Bestandteile des FVIII-Präparats gerichtete Antikörper, was auf eine erfolglose Immunisierung schließen läßt. Die in-vivo Immunisierung scheint für die Herstellung monoklonaler Antikörper effektiver zu sein. Ähnliche Erfahrungen sind auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht worden (Peters et al. 1985).

Fusion Nr.	Myelom-Zellen	anti FVIII:vWf-Ig produzierende Klone		
		Anzahl	% Ig prod.Klone	% aller Klone
I	Ag8	2	3	2
II	Ag8	17	16	11
III	NSI	2	8	2
IV	NSO	1	25	6
V	NSI	20	11	9
VI	NSI	1	1	1
VII	NSI	18	12	5
VIII	NSI	-	-	-

Tab. 9: Anzahl der Mikrotiterlöcher mit wachsenden Klonen, die Antikörper gegen FVIII:vWf produzieren

3.4.2 Klonierung der Hybridome

Da in einem Mikrotiterloch oft mehr als ein Klon heranwächst, werden positive Hybridzellen mehrmals einer Einzelzellklonierung unterworfen. Bei der Klonierung der Hybridomzellen werden drei unterschiedliche Methoden getestet:
1) Einzelzellverdünnungen in konditionierten Medien oder auf Milzzell-Feederlayer, 2) Klonierung in Weich-Agar, 3) Klonierung in Methylzellulose.

Bei der Einzelzellverdünnung werden Hybridzellen in eine Mikrotiterplatte so ausgesät, daß statistisch eine Zelle pro Loch pipettiert wird. Da die Ausbeute der Klonierung bei den Hybridzellen auf Grund der hohen physiologischen Belastung unterschiedlich sein kann, werden jeweils drei Mikrotiterplatten mit 0,3, 1 und 10 Zellen pro Loch beschickt. Die Platten müssen täglich auf Einzelklone hin überprüft werden, da Hybridklone oft unterschiedlich schnell wachsen. Wenn in 37 % der Löcher einer Platte kein Zellwachstum nachweisbar ist, kann man von einer Klonalität der in den übrigen Löchern anwachsenden Hybridzellen ausgehen (Goding 1980).
Die Zellen werden auf einem Feederlayer aus Milzzellen oder in konditionierten Medien (siehe 2.10.7) ausgesät. Die Milzzellen fördern durch Konditionierung des Mediums die Proliferation der Einzelzellen. Aus der Literatur ist bekannt, daß konditionierte Medien von Kulturen humaner Nabelschnur-Endothelialzellen (HECS) das Wachstum von Maus-Hybridomzellen fördert und das Klonieren von Einzelzellen erleichtert (Pintus et al. 1983).
Bei den Klonierungen auf Feederlayer und in Medien mit 20 % HECS können monoklonale Hybridome isoliert werden. Klonierungen in den mit 5 % ESG (Hybridoma Wachstumsfaktor, Costar Biologicals) konditionierten Medien zeigen hingegen keinen Erfolg.

Der Kulturüberstand von Endothelialzellen muß allerdings kurz vor der Klonierung gewonnen werden, da mit länger gelagerten oder eingefrorenen Überstanden schlechtere Ergebnisse erzielt werden. Bei allen Einzelzellverdünnungen kann die Klonaliät nach der Poissonverteilung gewährleistet werden.

Bei der Agarklonierung werden 250 bis 4000 Zellen in Weichagar suspendiert und auf einer Bodenagarschicht (mit Milzzellen bzw. HECS und ESG) verteilt (siehe 2.10.8). Nach einer Woche Kulturdauer sind einige Zellkolonien sichtbar. Die Klone werden isoliert und auf Mikrotiterplatten Übertragen. Da die Klone schlecht anwachsen, werden sie auf Feederlayer oder in Medium mit 20 % HECS kultiviert. Die Ausbeute an Hybridklonen ist gegenüber der Einzelzellklonierung gering.

Die Klonierung von Hybridzellen in Methylzellulose (siehe 2.10.9) zeigt gegenüber der Agarklonierung bessere Ergebnisse. Die Isolierung einzeln gewachsener Klone aus Methylzellulose erweist sich jedoch als schwierig. Durch das Aufziehen der Zellen eines Klones in die Pipette besteht die Gefahr, daß sich die Zellen benachbarter Klone vermischen und somit nicht mehr isoliert werden können. Die aus Methylzellulose isolierten positiven Klone werden zur Sicherheit durch Einzelzellverdünnung rekloniert.

Beim Vergleich aller oben aufgeführten Methoden erweist sich die Einzelzellverdünnung auf Feederlayer am effektivsten. Gut wachsende Hybridklone mit hoher Antikörperproduktion werden in großem Maßstab weiterkultiviert und rekloniert. Zur Verhindèrung des Verlusts von positiven Hybridomen durch Kontamination, Überwachsen durch nicht-produzierende Zellen oder Mutation in der Kultur, werden Aliquots positiver Kulturen über flüssigem Stickstoff konserviert (Durchführung siehe 2.9.4).

3.4.3 Wachstum und Antikörperproduktion der Hybridklone

Die Wachstums- und Produktionskinetik des Hybridklons 126/38, der Antikörper gegen FVIII:vWf sezerniert, ist in der Abbildung 18 wiedergegeben. Die Zellen werden im Batch-Verfahren in kleinen Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Zelldichte beträgt beim Animpfen $2x10^5$ Zellen pro ml (Lebendzellzahl).

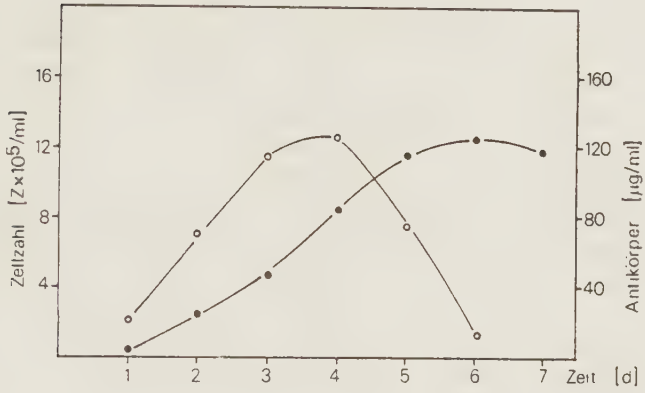


Abb. 18: Wachstums- und Produktionskinetik des Hybridklons 126/38 in HGDM + 10 % FCS
Lebendzellzahl o——o
Antikörpergehalt des Kulturmediums •——•
Tag 1= Animpftag

Die Zellen produzieren innerhalb der ersten 24 Stunden 23 µg Antikörper pro ml Kulturmedium. In der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen steigt der Antikörpergehalt des Mediums kontinuirlich an. Nach dem 4. Tag ist nur noch eine geringe Zunahme der Antikörpermenge zu beobachten, die Zellen gehen von der stationären Wachstumsphase in die Absterbephase über.

Der Antikörpergehalt der Kulturüberstände aller anti-FVIII:vWf, anti-Fibrinogen und anti-Fibronectin produzierenden Hybridklone nach 5 Tagen Kulturdauer ist in Tabelle 10 wiedergegeben. Die Hybridome werden mit $2x10^5$ Z/ml angeimpft und nach 5 Tagen geerntet. Der Antikörpergehalt wird mittels ELISA (siehe 2.11.3) bestimmt und liegt je nach Hybridklon zwischen 47 und 213 µg/ml Kulturüberstand.

Hybridom Nr.	Fusion Nr.	Antikörper gegen	Antikörperpoduktion µg/ml in 5 Tagen
23/21/09	II	FVIII:vWf	47
65/01/12	III	FVIII:vWf	130
72/01/08	III	FVIII:vWf	213
4/22/04	IV	FVIII:vWf	132
9/14/02	V	FVIII:vWf	48
112/31	VII	FVIII:vWf	63
117/25	VII	FVIII:vWf	186
126/38	VII	FVIII:vWf	120
76/18	VII	Fibrinogen	101
5/20	VII	Fibrinogen	126
3/25	VII	Fibronectin	156

Tab. 10: Antikörpergehalt der Kulturüberstände nach 5 Tagen Kulturdauer
Animpfdichte: $2x10^5$ Z/ml
Medium: HGDM bzw. IF + 10 % FCS
Zur Bestimmung des IgG-Gehalts wird der in Kapitel 2.11.3 beschriebene ELISA eingesetzt. Da Antikörper der IgM-Klasse mit diesem Test nicht erfasst werden, ist der Hybridklon 48/3/11 hier nicht aufgeführt.

3.4.4 Isolierung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberüberständen

Zur Gewinnung größerer Antikörpermengen werden die Hybridzellen wie in Abschnitt 2.10.10 beschrieben, an serumfreies Medium adaptiert und in einem Hohlfaserreaktor kultiviert (durchgeführt von Dipl. Biol. Volker Jäger, Abt. Bioverfahrenstechnik). Die aus der Fermentation gewonnen Kulturüberstände werden 10 min bei 500xg abzentrifugiert.

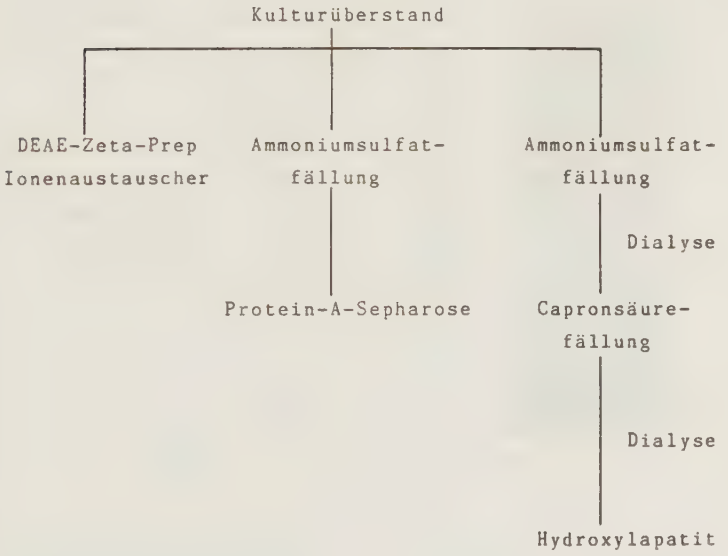


Abb. 19: Methoden zur Reinigung der Antikörper aus Kulturüberstand

Wie aus Abbildung 19 zu ersehen, werden drei verschiedene Methoden zur Isolierung der Antikörper getestet.

Die Durchführung der Versuche ist in Abschnitt 2.12 beschrieben.
Die Antikörperreinigung an Hydroxylapatit- und Zeta-Prep-DEAE Disk (AMF) zeigt gegenüber der Protein-A-Affinitätschromatographie wenig Erfolg. Abbildung 20 zeigt ein 10 %iges SDS- Gel mit den IgG- haltigen Fraktionen der Hydroxylapatit- (Spur 2) und DEAE- Chromatographie (Spur 3). Die Proben weisen noch starke Verunreinigungen durch BSA auf. Als Kontolle dient Maus-IgG der Fa. Sigma (Spur 1).

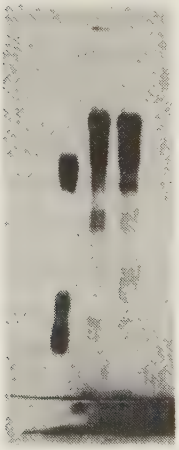


Abb. 20: 10 %iges SDS-Gel

je 2 µg Protein (red.)
Silberfärbung
Spur 1: Maus-IgG
Spur 2: IgG-Fraktion
Hydroxylapatit
Spur 3: IgG-Fraktion
DEAE-Zeta-Prep

Eine erfolgreiche Isolierung der Immunglobuline wird durch Chromatographie der Ammoniumsulfat-gefällten Fraktion von Kulturüberstand an Protein-A-Sepharose erreicht. Diese Affinitätschromatographie beruht auf der starken Bindung zwischen Protein A aus Staphylococcus aureus und dem Fc-Teil von Immunglobulin G.
Fremdproteine werden durch das Waschen des Säulenmaterials abgetrennt. Die Elution der Antikörper erfolgt durch einen Puffer mit niedrigem pH-Wert.

In Abbildung 21 ist das Elutionsprofil einer affinitätschromatographischen Reinigung eines monklonalen Antikörpers (Subklasse IgG_1) an Protein-A-Sepharose dargestellt.

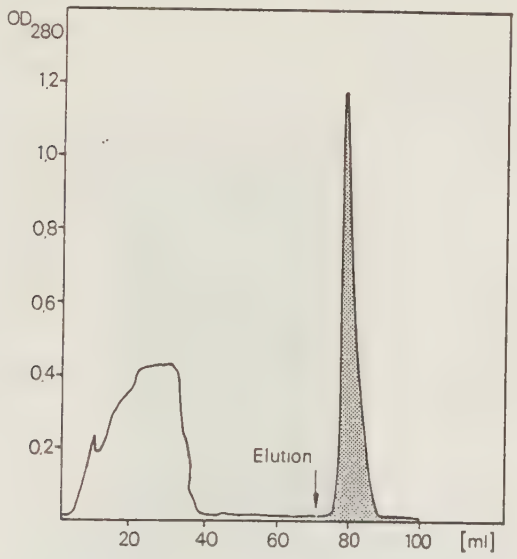
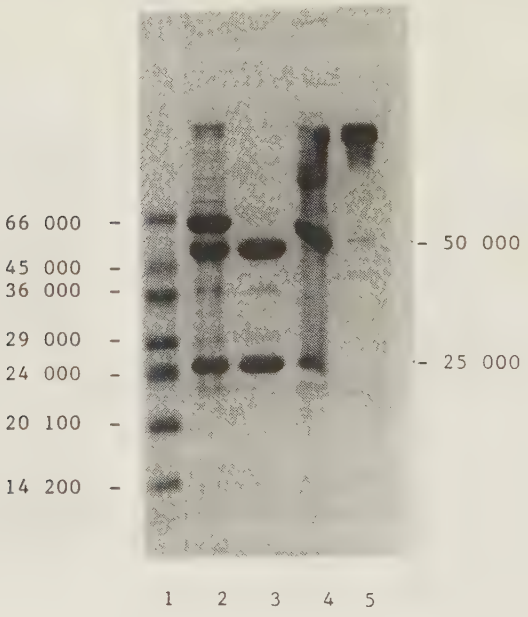


Abb. 21: Elutionsprofil einer Chromatographie an Protein-A-Sepharose mit Ammoniumsulfat-gefälltem Kulturüberstand
▒ - IgG-haltige Fraktionen

Die Antikörpergehalt der Kulturüberstände, der Ammoniumsulfat-gefällten Proben und der Peaks I und II nach der Protein-A-Chromatographie wird mit Hilfe des quantitativen ELISA (siehe 2.11.3) bestimmt. Die Ausbeute an Antikörpern nach der Ammoniumsulfatfällung beträgt durchschnittlich 95 %, die Ausbeute nach der Affinitätschromatographie liegt bei allen Säulenläufen über 90 %. Zur Ermittlung der Reinheit der IgG-haltigen Frakionen werden die Proteine in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abb. 22).

Während die Ammoniumsulfat-gefällte Probe noch Verunreinigungen mit BSA (66 000 D) aufweist (Spur 2), zeigt die affinitätschromatographisch gereinigte Probe nur zwei Banden mit den Molekulargewichten 50 und 25 kD. Diese entsprechen den H-Ketten (50 000 D) und den L-Ketten (25 000 D) des Immunglobulin G.

Abb. 22: 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel



Spur 1 : LMW-Standardgemisch
Spur 2 und 4: IgG nach Ammoniumsulfatfällung
reduziert (2), nicht reduziert (4)
Spur 3 und 5: IgG nach Protein-A-Sepharose
reduziert (3), nicht reduziert (5)
5 µg Protein/Schacht

3.5 Charakterisierung der Antikörper

Zur näheren Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wird ihre Klassen- bzw. Subklassenzugehörigkeit im Doppeldiffusionstest und ELISA mit Hilfe klassenspezifischer Antikörper gegen Maus-Immunglobuline bestimmt. Die Antigenspezifität der monoklonalen Antikörper wird mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie mit fixierten Endothelialzellen und Thrombozyten und durch Immunpräzipitation mit ^{125}J markiertem Antigen ermittelt. Ferner wird die Reaktivität der Antikörper mit den auf Nitrozellulose immobilisierten Antigenen und der Einfluß der anti-FVIII:vWf Antikörper auf die Ristocetin vermittelte Thrombozytenaggregation getestet.

3.5.1 Bestimmung der Antikörperklasse und Subklasse

A B

Abb. 23: Doppeldiffusionstest zur Bestimmung der Antikörperklasse
Mittlere Löcher: Ziegen Antiserum, das gegen Maus IgG (A) bzw. IgM (B) gerichtet ist.
Äußere Löcher: Verdünnungen eines durch Ammoniumsulfatfällung 10fach konzentrierten Überstandes 2^1 bis 2^6 (Loch 1-6)

Die Antikörperklasse wird zunächst mit Hilfe des Doppeldiffusionstests bestimmt.
In die mittleren Löcher werden jeweils 5 µl eines gegen Maus-IgG bzw. IgM gerichteten Antiserums pipettiert. Die äußeren Löcher werden mit Verdünnungen eines 10fach konzentrierten Kulturüberstandes beschickt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wird das Gel, wie in Abschnitt 2.11.9 beschrieben, gewaschen, getrocknet und mit Coomassie gefärbt. Die in Abbildung 23 zu erkennenden Präzipitationslinien zeigen, daß der getestete Kulturüberstand Antikörper der Klasse IgG enthält.

Aufgrund der höheren Sensitivität und der schnelleren Durchführbarkeit erfolgt die Subklassenbestimmung durch ELISA mit Hilfe eines Test-Sets (Mono Ab-ID EIA Kit, Zymed). Die Durchführung ist in Kapitel 2.11.4 beschrieben.
Von den insgesamt 14 erhaltenen monoklonalen Antikörpern können 10 der Subklasse IgG_1, zwei der Subklasse IgG_3 und einer der Subklasse IgG_{2a} zugeordnet werden; ein Antikörper gehört der IgM Klasse an (siehe auch Tab. 12). Alle Antikörper besitzen k-leichte Ketten. In Mäusen besitzen 95 % der Antikörper k-leichte Ketten (Campbell,1984).

3.5.2 Nachweis der Antigenspezifität durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit adhärenten Zellen und Thrombozyten

Die Kulturüberstände antikörperproduzierender Hybridzellen werden auf Endothelialzellen getestet, da diese als Syntheseorte von FVIII:vWf bekannt sind (Jaffe et al. 1973). Die in Mikrotiterplatten konfluent gewachsenen humanen Endothelialzellen werden mit Ethanol fixiert und mit Kulturüberständen inkubiert.

Mit Hilfe FITC-markierter Antikörper, die gegen Maus-Immunglobuline gerichtet sind, können gebundene Antikörper durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden. Abbildung 24 zeigt die typische Immunfärbung von Endothelialzellen durch anti-FVIII:vWf Antikörper.

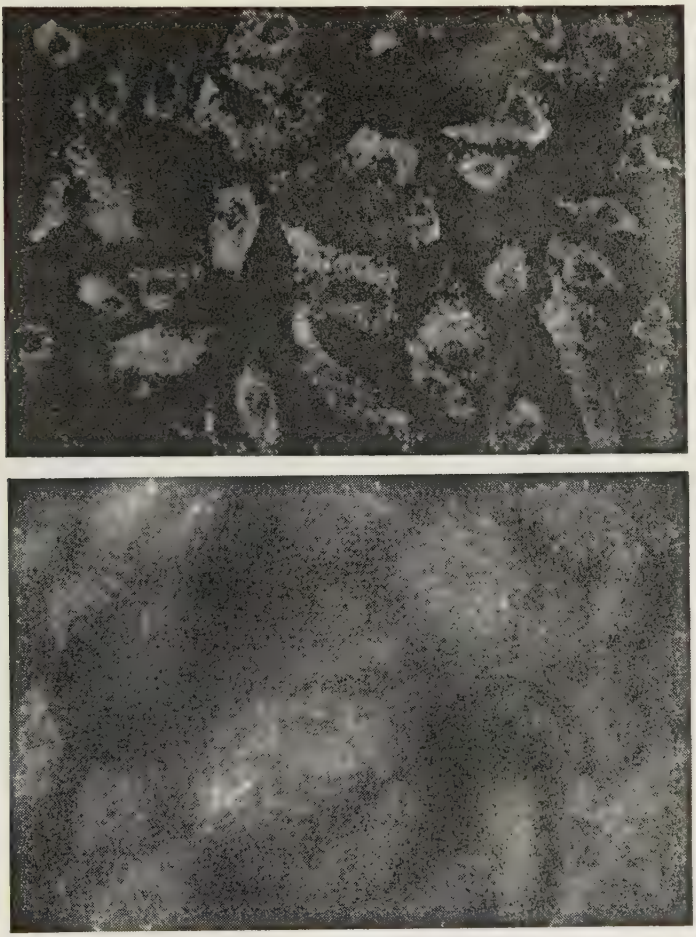
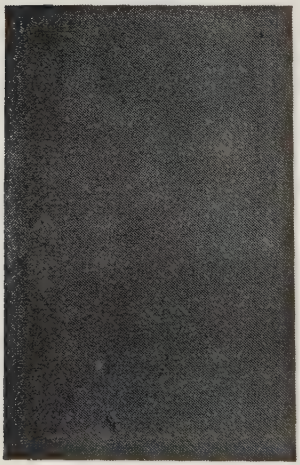


Abb. 24: Immunfärbung humaner Endothelialzellen durch anti-FVIII:vWf Antikörper, Vergrößerung: oben: 400x, unten: 1000x

Die Zellen sind mit einer Vielzahl fluoreszierender, länglicher Strukturen übersät.
Hierbei handelt es sich um sogenannte "Weibel-Palade-Körperchen" in denen FVIII:vWf eingelagert wird (Weibel und Palade 1964, Wagner et al. 1982).
Als Positivkontrolle wird polyklonales anti-FVIII:vWf Antiserum (Clotimmun, Behring AG), als Negativkontrolle Maus-IgG (20 µg/ml) eingesetzt. Das polyklonale Antiserum liefert vergleichbare Ergebnisse, zeigt allerdings aufgrund der geringeren Spezifität eine stärkere Hintergrundfärbung. Die Kontrolle mit Maus-IgG zeigt keine Fluoreszenz (siehe Abb. 25 a).

a)



b)

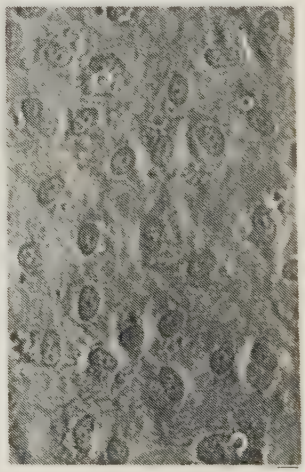


Abb. 25: a) Kontrolle mit Maus-IgG (20 µg/ml)
b) Endothelialzellen vor der Immunfärbung
Vergrößerung: 400x

Tau exhibits antibodies which in fluorescence and immunoblotting are specific for anti-PHF-tau antibodies but not for anti-normal tau antibodies.

Diese Antikörper zeigen in der Immunfluoreszenz an Hirnschnitten, die ausgefällte PHF-tau enthalten, eine positive Reaktion (siehe auch Fig.

Abb. 16 Immunfärbung von Hirnschnitten durch ausgefällte anti-PHF-tau Antikörper
Immunfärbung durch 4.11.F
Vergrößerung 400x

In einer Immunreaktion mit Antikörpern anderer Zellen ausgefällten zu können, wurden die im Fluoreszenztest positiven Antikörper auch auf humanen Hirnschnitten (Fig) und Gewebsschnitten (AEF 42), Swiss 3T3, Balb/c) einmalig Immunfluoreszenz gefärbt. Die neun Antikörper sind in dieser Tabelle angegeben.

Neben anti-FVIII:vWf Antikörper können zwei weitere monoklonale Antikörper isoliert werden, die in der Fluoreszenzmikroskopie mit Endothelialzellen positiv sind, jedoch nicht die für FVIII:vWf typische Immunfärbung zeigen. Abbildung 27 zeigt die Immunfärbung der Zellen nach Inkubation mit dem Kulturüberstand des Hybridklons 62/1. Der Antikörper reagiert nicht mit FVIII:vWF, sondern mit einem Antigen, das sich im Bereich der Kernmembran befindet. Zellkerne und fibrilläre Strukturen der Endothelialzellen werden durch diesen Antikörper markiert.

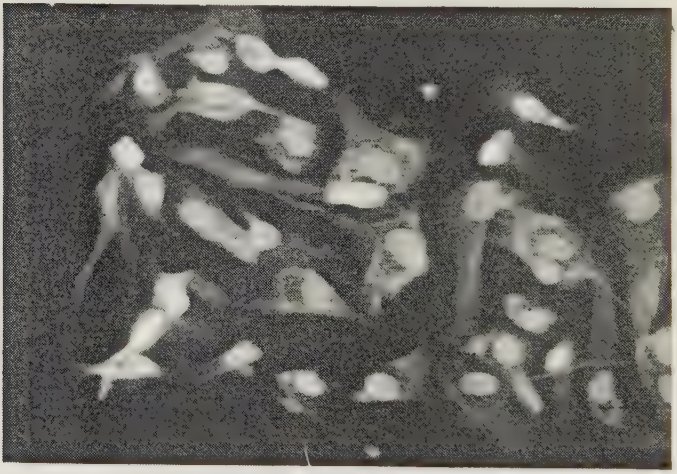


Abb. 27: Immunfärbung von Endothelialzellen durch Antikörper des Hybridklons 62/1 Vergrößerung: 400x

Die Immunfärbung der Endothelialzellen durch den Antikörper 76/47 ist in Abbildung 28 wiedergegeben.

Dieser Antikörper scheint gegen ein Antigen gerichtet zu sein, das mit den Chromosomen assoziert ist. Durch die Immunfärbung werden unterschiedliche Zellteilungsstadien sichtbar. Die Chromosomen der Metaphase sind deutlich gefärbt. Da die Chromosomen in der Interphase entspiralisiert sind, erscheinen einige Zellkerne durchgehend gefärbt.

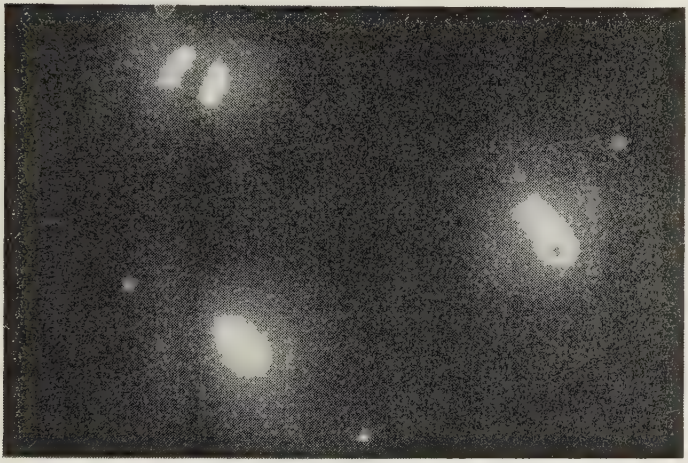


Abb. 28: Immunfärbung von Endothelialzellen mit Kulturüberstand des Hybridklons 76/47
Vergrößerung: 630x
Metaphasekern (rechts)
späte Anaphase bzw. Telophase (links)
Interphasekern (unten)

Der Antikörper 76/47 reagiert ebenfalls mit Swiss 3T3-, Balb/c-, AKR 431- und FS4-Zellen. Abbildung 29 zeigt die Immunfärbung von FS4-Zellen.

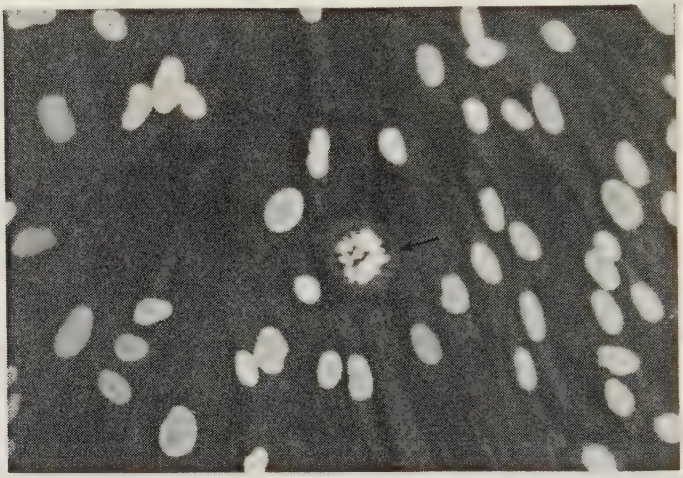


Abb. 29: Immunfärbung humaner Fibroblasten (FS4)
durch den Antikörper 76/47
Vergrößerung: 400x
Metaphasekern ⟶

3.5.3 Nachweis der Antigenspezifität mittels Immunpräzipitation

Neben der Fluoreszenzmikroskopie wird die Immunfällung mit ^{125}J-markiertem FVIII als Nachweis für die Spezifität der Antikörper eingesetzt.
Die Markierung der durch Gelfiltration angereicherten FVIII-Präparation wird, wie in Abschnitt 2.11.8 beschrieben, mit Hilfe der Lactoperoxidase - Glucose-Oxidase Methode durchgeführt. Für die Immunfällung wird 5 µl ^{125}J-markiertes Protein mit 100 µl Kulturüberstand und 900 µl Protein-A-Sepharose 4B (5mg/ml Bindungspuffer) über Nacht inkubiert.
Spezifische anti-FVIII:vWf Antikörper binden an das markierte Antigen. Antikörper der Immunglobulinklasse G werden über den Fc-Teil an Protein-A-Sepharose gebunden. Da die Bindung der verschiedenen Maus-IgG Subklassen an Protein A pH-abhängig ist (Ey et al. 1978, Seppälä et al. 1981), werden bei der Inkubation Bindungspuffer mit den pH Werten 7, 8 und 9 eingesetzt. Nach der Inkubation wird die Sepharose sedimentiert (Eppendorf-Zentrifuge). Nicht gebundene Proteine werden durch mehrmaliges Waschen des Sediments abgetrennt. Die Radioaktivität des Sediments wird im Gammazint gemessen.
Antikörper der Subklasse IgG_1 binden bei pH 8 und Antikörper der Subklasse IgG_3 bei pH 9 am stärksten an Protein A. Immunglobuline der Klasse M (Antikörper 48/3/11) binden nicht an Protein-A-Sepharose.

Die Proben werden mit 30 µl Probenpuffer versetzt und 10 min bei 65 °C reduziert. Die Proteine werden in einem Gradientengel (6-16%) elektrophoretisch aufgetrennt und nach der Silbermethode angefärbt. Nach Trocknung der Gele wird eine Autoradiographie durchgeführt.

Spur 10 in der Abbildung 30 zeigt das ^{125}J-markierte Protein vor der Immunfällung, Spur 8 und 9 zeigt die Negativ- bzw. Positivkontrolle (Fällung mit Maus IgG bzw. gekauftem anti-FVIII:vWf Antikörper).Das Molekulargewicht des Proteins, das durch die monoklonalen Antikörper (Spur 1-7) gebunden wird, beträgt 240 000 D und entspricht den Untereinheiten des FVIII:vWf.

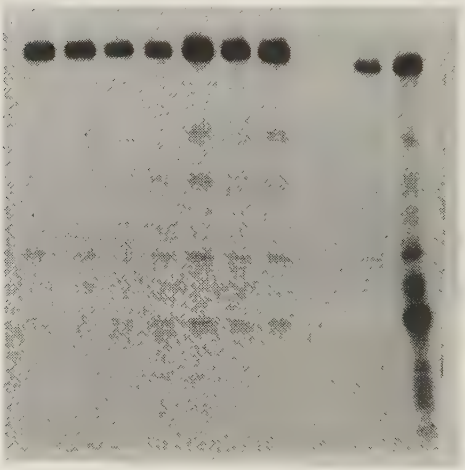


Abb. 30: Autoradiogramm der durch monoklonale anti- FVIII:vWf Antikörper gefällten ^{125}J -markierten Proteine

Spur 10 : ^{125}J-markierte FVIII-Präparation
Immunfällung durch:
Spur 9 : anti-FVIII:vWf Antikörper (Positivkontrolle)
Spur 8 : Maus-IgG (Negativkontrolle)
Spur 1-7: Kulturüberstände der bei der Fluoreszenzmikroskopie positven Hybridklone

3.5.4 Reaktivität der Antikörper im Immunblot

Die im Fluoreszenztest positiven Antikörper und die im ELISA mit Fibrinogen und Fibronectin positiven Antikörper werden im Immunoblot getestet. Die Proteine des FVIII-Präparats (Actif VIII) werden im einem SDS-Polyacrylamidgel und in einem Agarose-Gel aufgetrennt und wie in Abschnitt 2.11.5 beschrieben, auf Nitrozellulose transferiert. Ein Teil der Nitrozellulose wird mit Amido-Schwarz angefärbt; der Rest wird in Streifen geschnitten und mit den Kulturüberständen inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgt mit Peroxidase-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper.

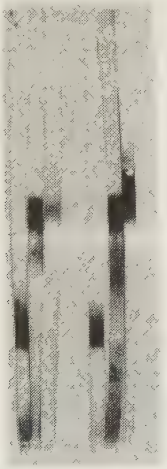


Abb. 31: Immunblot nach Agarose-Gelelektrophorese
Spur 1, 2, 3: Antiseren gegen Fibrinogen (1), Fibronectin (2), FVIII:vWf (3)
Spur 4, 5, 6: Kulturüberstand von Hybridom
76/18 (anti-Fibrinogen)
3/25 (anti-Fibronectin)
4/22/04 (anti-FVIII:vWf)

Hybridom bzw. Antiserum	Blot mit SDS-PAG	Blot mit Agarose-Gel	Antigen
FVIII:vWf			
Antiserum	+	+	FVIII:vWf
23/21/09	-	++	FVIII:vWf
65/01/12	-	+	FVIII:vWf
72/01/08	-	+	FVIII:vWf
4/22/04	-	++	FVIII:vWf
9/14/02	-	++	FVIII:vWf
48/03/11	-	++	FVIII:vWf
112/31	-	++	FVIII:vWf
117/25	-	++	FVIII:vWf
126/38	-	++	FVIII:vWf
Fibrinogen			
Antiserum	+	++	Fibrinogen
5/20	-	++	Fibrinogen
76/18	-	++	Fibrinogen
Fibronectin			
Antiserum	+	++	Fibronectin
3/25	-	+	Fibronectin
62/1	-	-	unbekannt
76/47	-	-	unbekannt

Tab. 11: Reaktivität der monoklonalen Antikörper im Immunoblot mit denaturiertem und nicht denaturiertem Antigen (SDS- und Agarose-Gel) Durchführung siehe 2.13.5
- negativ, + positiv, ++ stark positiv

Wie aus Tabelle 11 zu ersehen, binden die monoklonalen Antikörper nicht an die im SDS- Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine. Die denaturierten Untereinheiten des Antigens werden von den Antikörpern nicht erkannt.

Werden die Proteine des FVIII-Präparats im Agarose-Gel unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit den Kulturüberständen inkubiert, so zeigen alle Antikörper eine positive Reaktion (siehe Abb. 31 und Tab. 11). Polyklonale Antiseren gegen Fibrinogen, Fibronectin und FVIII:vWf (Behring AG) binden sowohl an das native als auch an das denaturierte und reduzierte Protein.
Die im Fluoreszenztest positiven Antikörper 62/1 und 76/47 reagieren nicht mit den im SDS-Gel bzw. im Agarose-Gel aufgetrennten Proteinen. Der Antikörper 76/47, der an chromosomale Strukturen bindet, könnte möglicherweise gegen Histone gerichtet sein. Um dies zu klären, wird ein Gesamt-Histon-Präparat (25 µg) in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt, im elektrischen Feld auf Nitrozellulose übertragen und mit dem Antikörper inkubiert. Dieser zeigt jedoch keine spezifische Bindung an eine der aufgetrennten Histone.

3.5.5 Einfluß der anti-FVIII:vWF Antikörper auf die Ristocetin abhängige Thrombozytenaggregation

Ristocetin ist ein gegen grampositive Bakterien wirksames Antibiotikum, das aus Kulturüberständen von Nocardia lurida isoliert wird (Wallas und Strominger 1963). Howard und Firkin (1971) beobachteten erstmals, daß durch Zugabe von Ristocetin zu einer Thrombozytensuspension eine Verklumpung der Thrombozyten eintritt. Heute ist bekannt, das Ristocetin die Bindung des FVIII:vWf an das Glykoprotein Ib der Plättchenmembran vermittelt und dadurch die Aggregation der Thrombozyten auslöst (Handa et al. 1986).
Der Einfluß der monoklonalen anti-FVIII:vWf Antikörper auf die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (FVIIIR:RCo) des von Willebrand Faktors wird in einem Aggregationstest untersucht.

Die Aggregationsmessungen werden in einem Spektrophotometer mit eingebautem Rührwerk durchgeführt und auf einem Schreiber dokumentiert (Durchführung siehe Kap. 2.1.3). Es werden zunächst Versuche mit unterschiedlichen Ristocetinmengen durchgeführt, um die für eine vollständige Aggregation notwendige minimale Ristocetinkonzentration zu ermitteln.
Abbildung 32 zeigt den Aggregationverlauf nach Zugabe von 100 µl Ristocetinlösung (15 mg/ml) zu einer Thrombozytensuspension von $2{,}5 \times 10^5$ Z/2 ml.

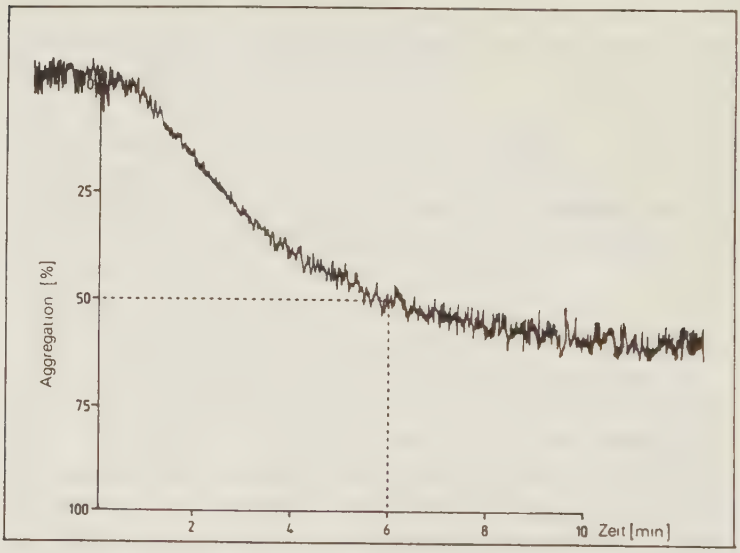


Abb. 32: Ristocetin vermittelte Thrombozytenaggregation
50% Aggregation wird 6 min nach Ristocetin-Zugabe erreicht.

Um den Einfluß der Antikörper zu testen, wird die Thrombozytensuspension mit Kulturüberstand bzw. gereinigten Antikörperüberständen 5 Minuten vorinkubiert. Es werden bis zu 800 µg Antikörper im Test eingesetzt. Nach Zugabe von Ristocetin wird der Kurvenverlauf über 30 min verfolgt.

Der nach 10 min erreichte Aggregationswert (%) und der Zeitpunkt, an dem 50 % Aggregation eingetreten ist, wird ermittelt und mit den Werten der Kontrollmessung (ohne Antikörper) verglichen. Neben den monoklonalen Antikörpern wird anti-FVIII:vWf Antiserum eingesetzt (Positivkonrolle). Beim Einsatz des Antiserums (1:20, 1:40 Verdünnung) tritt eine vollständige Hemmung der Aggregation ein. Stärkere Verdünnung (1:200) bewirkt eine Reduktion der Thrombozytenaggregation (siehe Abb.33). Ein Einfluß des im Antiserum enthaltenen NaN_3 kann nach einer Kontrollmessung (ohne Antiserum) mit entsprechenden NaN_3 Zusatz ausgeschlossen werden. Die monoklonalen Antikörper bewirken keine Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die Antikörper scheinen nicht gegen die für die Bindung an das Glykoprotein Ib verantwortlichen Strukturen des FVIII:vWf gerichtet zu sein.

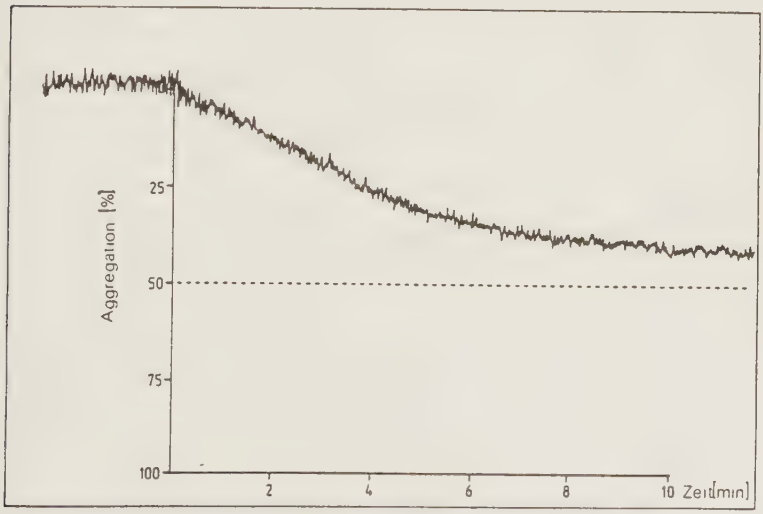


Abb. 33: Aggregationsverlauf nach Inkubation mit anti-FVIII:vWf Antiserum (1:200 Verdünnung) Der 50 % Aggregationswert wird nicht erreicht.

3.5.6 Zusammenfassung der charakteristischen Eigenschaften der monoklonalen Antikörper

Aus acht Fusionen können insgesamt 14 gut wachsende und stabile Hybridklone isoliert werden, die Antikörper gegen FVIII:vWf und andere Plasmaproteine sezernieren.
Die Antigenspezifität wird mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie bzw. ELISA bestimmt und durch Immunfällung und Immunblot bestätigt. Die Antigenspezifität der Antikörper 62/1 und 76/47 kann anhand der durchgeführten Versuche nicht ermittelt werden, und wird aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt. In Tabelle 12 sind die charakteristischen Eigenschaften der Antikörper zusammenfassend dargestellt.

Fusion Nr.	Myelom-zellinie	Antikörper Nr.	Antikörper subklasse	Antikörper-produktion	Protein A-Bindung	Immun-fällung	Immunblot a	Immunblot b	Immunfluoreszenz A	B	C	D	E	gerichtet gegen
II	Ag8	23/21/09	IgG_1	47	+	++	-	++	++	+	-	-	-	FVIII:vWf
III	NSI	65/01/12	IgG_3	130	+	+	-	+	+	+	-	-	-	FVIII:vWf
III	NSI	72/01/08	IgG_3	213	+	+	-	+	+	+	-	-	-	FVIII:vWf
IV	NSO	4/22/04	IgG_1	132	+	++	-	++	++	+	-	-	-	FVIII:vWf
V	NSI	9/14/02	IgG_1	48	+	++	-	++	++	+	-	-	-	FVIII:vWf
VI	NSI	48/03/11	IgM	n.b.	-	-	-	++	+	+	-	-	-	FVIII:vWf
VII	NSI	112/31	IgG_1	63	+	++	-	++	++	+	-	-	-	FVIII:vWf
VII	NSI	117/25	IgG_1	186	+	++	-	++	++	+	-	-	-	FVIII:vWf
VII	NSI	126/38	IgG_1	120	+	++	-	++	++	+	-	-	-	FVIII:vWf
I	Ag8	62/01	IgG_1	n.b.	n.b.	-	-	-	++	-	++	++	++	[1] unbekannt
VII	NSI	76/47	IgG_{2a}	n.b.	n.b.	-	-	-	++	-	-	n.b.	n.b	[2] unbekannt
VII	NSI	76/18	IgG_1	101	n.b.	n.b.	-	++	positiv im ELISA					Fibrinogen
VII	NSI	5/20	IgG_1	126	n.b.	n.b.	-	++	positiv im ELISA					Fibrinogen
VII	NSI	3/25	IgG_1	156	n.b.	n.b.	-	+	positiv im ELISA					Fibronectin

Tab. 12: Zusammenfassung der charakteristischen Eigenschaften der monoklonalen Antikörper

- negativ + positiv ++ stark positiv

A= Endothelialzellen B= Thrombozyten C= AKR 431 D= Swiss 3T3 E= Balb/c

1) ebenfalls positiv auf FS4 (humane Fibroblasten), 2) auch positiv auf humanen Fibroblasten, Fibrosarkomzellinie HA 1781, negativ auf U2OS- (Osteosarkom) und T24- (Blasenkarzinom) Zellen

a= denaturiertes und reduziertes Protein b= nicht denaturiert, nicht reduziert, Antikörperproduktion siehe 3.4.3

3.6 Anreicherung von FVIII:C mittels Immunaffinitätschromatographie

3.6.1 Herstellung der Immunaffinitätssäule

Die aus Fermentationsüberständen durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie an Protein-A-Sepharose (siehe 2.12) gereinigten Antikörper des Hybridklons 126/38 werden an verschiedene Säulenmaterialien gekoppelt, um die für die Reinigung geeigneten Trägermaterialien und Kopplungsverfahren zu ermitteln. Die gereinigten Antikörper werden an Sepharose 2B, AH-Sepharose 4B, AH-Eupergit und AH-SP 500 immobilisiert. Die Kopplung der Antikörper an Sepharose 2B erfolgt durch CNBr-Aktivierung (Abb.34), die Kopplung an die Aminohexyl (AH)-substituierten Trägermaterialien erfolgt mittels Carbodiimid (Abb.35).

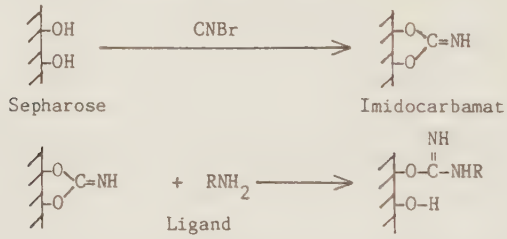


Abb. 34: Kopplung von Liganden an CNBr-aktivierte Sepharose

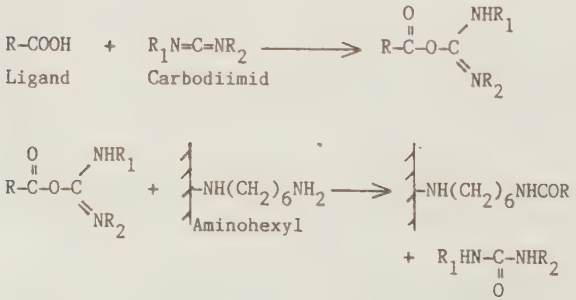


Abb. 35: Kopplung von Liganden an Aminohexyl-substituierten Trägern mittels Carbodiimid

Die Kopplung erfolgt wie in Abschnitt 2.13 beschrieben, mit 1,6 mg Antikörper pro 1 g Säulenmaterial. Um den Prozentsatz gebundener Antikörper zu ermitteln, wird nach erfolgter Kopplung der Proteingehalt des Überstandes bestimmt. Bei der Carbodiimid-Kopplung werden ca. 95 % der eingesetzten Antikörper gebunden. An die CNBr-aktivierte Sepharose 2B können 72 % der Antikörper gekoppelt werden. Die Gele werden gewaschen, mit Ethanolamin abgesättigt, in eine Säule gefüllt (C10/20, Pharmacia) und mit Imidazolpuffer äquilibriert.

3.6.2 Anreicherung von FVIII:C aus humanem Plasma

Die Immunaffinitätschromatographie wird mit Plasma durchgeführt, das wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, aus humanen Thrombozytenkonzentraten (DRK-Blutspendedienst, Springe) gewonnen wird. Nach Adsorption des FVIII-Komplexes wird FVIII:C durch 255 mM $CaCl_2$ vom Komplex abgespalten und eluiert. FVIII:vWf kann durch Behandlung mit 2 M $MgCl_2$ abgelöst werden, so daß die Antikörpersäule mehrmals zu verwenden ist (siehe Abb.36).

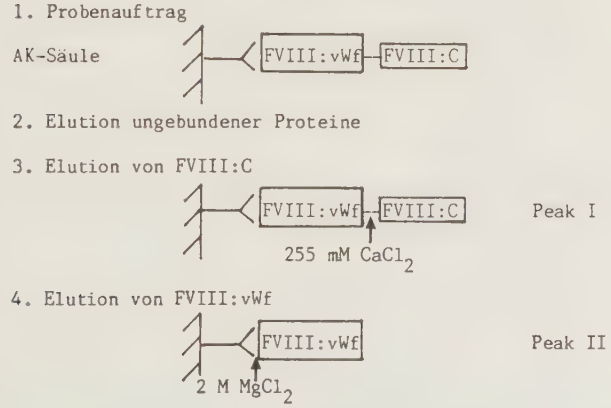


Abb. 36: Schema der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von FVIII:C

Mit Hilfe der Immundiffusion (siehe 2.11.10) werden die Fraktionen auf FVIII:vWf, Fibrinogen und Fibronectin hin untersucht (siehe Abb.37). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

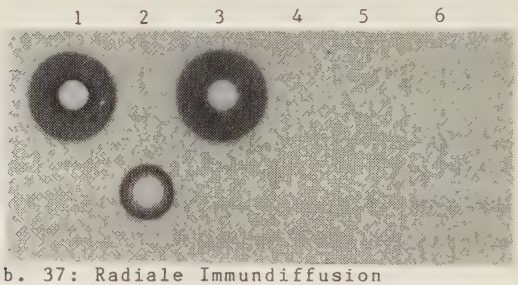


Abb. 37: Radiale Immundiffusion
1-3 positive (+), 4-6 negative (-) Fraktionen

Träger-material	Fraktion (Abb.36)	FVIII:vWf	Fibrinogen	Fibronectin
Sepharose 2B	Waschen	+	+	+
	Peak I	-	-	-
	Peak II	+	-	-
AH-SP 500	Waschen	-	+	-
	Peak I	-	+	-
	Peak II	+	+	+
AH-Eupergit	Waschen	+	+	+
	Peak I	-	-	-
	Peak II	-	-	-
AH-Sepharose	Waschen	+	+	+
	Peak I	-	-	-
	Peak II	-	-	-

Tab. 13: Nachweis von FVIII:vWf, Fibrinogen und Fibronectin in den Fraktionen nach der Immunaffinitätschromatographie (siehe auch Abb.36 und 37)

Bei einer erfolgreich durchgeführten Chromatographie sollte FVIII:vWf in Peak II nachzuweisen sein. Ferner sollten die Fraktionen von Peak I und II kein Fibrinogen und Fibronectin enthalten. Diese Bedingungen werden nur von der Antikörpersäule 126/38-Sepharose 2B erfüllt. Das Trägermaterial AH-SP 500 ist für die immunaffinitätschromatographische Reinigung ungeeignet, da in Peak I Fibrinogen, und in Peak II neben FVIII:vWf auch Fibrinogen und Fibronectin detektiert wird. Die Bindung der Proteine ist vermutlich auf die Wirkung dieses Säulenmaterials als Ionenaustauscher zurückzuführen. Bei den beiden, nach gleichem Kopplungsverfahren hergestellten Antikörpersäulen (AH-Eupergit, AH-Sepharose 4B) kann im Peak II kein FVIII:vWf nachgewiesen werden.

Die CNBr-aktivierte Sepharose 2B erweist sich für die Immunaffinitätschromatographie am geeignetsten und wird für die Herstellung einer Antikörpersäule verwendet, an die 11 mg des Antikörpers 126/38 gekoppelt werden. Die Beladungsdichte beträgt 0,75 mg/ml Gel. Abbildung 38 zeigt das Elutionsprofil der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von FVIII:C aus humanem Plasma. Diese Chromatographie wird mit Plasma (20-45 ml) insgesamt siebenmal wiederholt. FVIII:C kann mit Hilfe dieser Antikörpersäule durschnittlich 22 000 fach angereichert werden (siehe Tab.14).

	FVIII:C Aktivität		Protein		Reinigungsfaktor
	E	E/mg	mg/ml	mg	
Plasma	14	0,007	77	1925	1
Ak-Säule	7,7	152	0,0036	0,05	22 000

Tab. 14: Bilanz der Immunaffinitätschromatographie

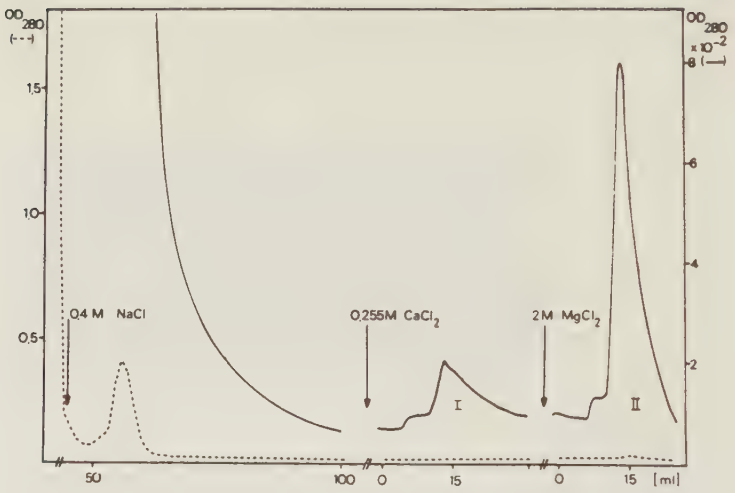


Abb. 38: Elutionsprofil der Reinigung von FVIII:C mit Hilfe der Antikörpersäule 126/38 Sepharose 2B
Durchführung siehe 2.7.2
FVIII:C - Peak I , FVIII:vWf - Peak II
OD^{280} ----- , OD^{280} x 10^{-2} ———

Fraktionen mit FVIII:C Aktivität werden vereinigt (Peak I) und über Nacht gegen Imidazolpuffer (10 mM, pH 7,35) dialysiert und eingetrocknet. Das Sediment wird in Probenpuffer aufgenommen und auf ein 6%iges Polyacrylamidgel augetragen. Die Proteinbanden werden mit der Silbernitratfärbung sichtbar gemacht.
Wie aus Abbildung 39 zu ersehen, ist die FVIII:C Präparation nicht homogen und zeigt Verunreinigungen mit den Plasmaproteinen HSA und Fibrinogen (untere Banden).

Der Fibrinogengehalt der Präparation liegt unter der Nachweisgrenze des Mancini-Tests (10 µg/ml).
Die drei schwach gefärbten Proteinbanden mit den Molekulargewichten von 180, 150 und 130 kD und die stärker gefärbte 80 kD Bande werden nach Vergleich mit Literaturwerten (Andersson et al. 1986) dem FVIII:C zugeordnet (siehe Kap. 4).

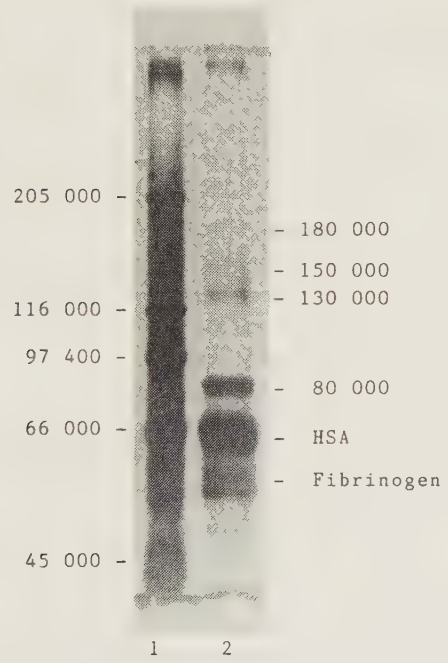


Abb. 39: 6%iges SDS-Polyacryamidgel mit angereicherter FVIII:C Präparation (Silberfärbung)
Spur 1: Molekulargewichtsmarker
Spur 2: FVIII:C nach Immunaffinitäts-chromatographie (Peak I)
3 µg Protein (reduziert)

3.7 Aminosäuresequenzierung

Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz des Aminotermius von FVIII:C wird eine größere Menge homogenen Proteins benötigt. In einer Reihe von Versuchen wird eine weitere Reinigung und Konzentrierung der angereicherten FVIII:C Präparation angestrebt.

1) Hydrophobe Chromatographie
Eine immunaffinitätsgereinigte FVIII:C Präparation (0,03 mg/10 ml) wird auf die HPLC-Säule (rp8, reversed phase) aufgetragen und wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben eluiert. Es werden 60 Fraktionen gesammelt, von denen jeweils 20 µl abgenommen, eingetrocknet (Speed Vac.) und in einem 6%igen SDS-Gel aufgetrennt werden. Die Proteinbanden werden mit der Silberfärbung sichtbar gemacht. Anhand der Gele kann kein Reinigungseffekt festgestellt werden. Alle Fraktionen weisen in etwa das gleiche Bandenmuster auf.

2) Chromatographie an AH-Sepharose 4B
Nach Austen (1979) bindet FVIII:C bei niedriger Ionenstärke an AH-Sepharose und kann durch Einsatz von 255 mM $CaCl_2$ eluiert werden.
Die nach der Immunaffinitätschromatographie erhaltene FVIII:C Präparation (siehe 3.6.2) wird mit Imidazolpuffer verdünnt (1:10) und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit Imidazolpuffer wird mit 255 mM $CaCl_2$ eluiert (Durchführung siehe 2.7.3). In fünf Fraktionen kann FVIII:C Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivitätsausbeute beträgt 38 %. Eine weitere Reinigung wird durch Chromatographie an AH-Sepharose nicht erzielt. Nach Auftrennung der Proben in einem 6%igen SDS-Gel kann hinsichtlich des Bandenmusters kein Unterschied zu den immunaffinitätsgereinigten FVIII:C Proben festgestellt werden.

3) Isolierung einzelner Proteinbanden durch Auftrennung im SDS-Gel und Übertragung auf Glasfaserfilter

Da mit den oben aufgeführten Chromatographien keine weitere Reinigung von FVIII:C erzielt werden kann, soll nach der von Aebersold et al. (1986) beschriebenen Methode eine Isolierung und Sequenzierung einzelner Proteinbanden durchgeführt werden.
Die Proteine der FVIII:C Präparation werden in einem 6%igen SDS-Gel (10 µg / Schacht) aufgetrennt und elektrophoretisch auf einen vorbehandelten Glasfaserfilter transferiert. Die optimale Transferdauer wird, wie unter Punkt 2.8 beschrieben, ermittelt. Sie beträgt bei einer Spannung von 50 V 25 Minuten. Der Glasfaserfilter wird getrocknet und in der Färbelösung (siehe 2.8) inkubiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt mit Hilfe einer UV-Lampe (254 nm). Die fluoreszierenden Proteinbanden werden aus dem Filter herausgeschnitten und in die dafür vorgesehene Halterung des Aminosäuresequenzers gelegt. Der Abbau und die Isolierung der Aminosäuren erfolgt nach einem Standardprogramm von (Applied Biosystems).
Die Aminosäuresequenz der einzelnen Polypeptide kann nicht ermittelt werden, da die auf Glasfaserfilter transferierte Proteinmenge (unter 20 ng/Bande) nicht ausreichend ist.

Eine für die Aminosäuresequenzierung ausreichende Proteinmenge kann mit der vorhandenen Antikörpersäule nicht hergestellt werden. Für die Herstellung einer präparativen Immunaffinitätssäule wären weitere Fermentationen erforderlich. Für die Bereitstellung genügender Mengen an FVIII:C müssten mehrere Liter Plasma aufgearbeitet werden. Aufgrund des enormen Kosten- und Zeitaufwandes können diese Versuche im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4. DISKUSSION

Obwohl die monoklonalen Antikörper im Gegensatz zu der fast gleichzeitig entwickelten DNA-Rekombinations-Technik vergleichsweise unbemerkt Eingang in die Forschung gefunden hat, ist die von Köhler und Milstein (1975) entwickelte Technik der Herstellung von monoklonalen Antikörpern durch Zellfusion eine der wichtigsten Fortschritte des letzten Jahrzehnts. Neben ihrer Bedeutung für die Immunologie und die Grundlagenforschung bieten die monoklonalen Antikörper aufgrund ihrer Spezifität in vielen Anwendungsbereichen (Diagnostik, Therapie, Identifizierung von Zellen und ihrer Differenzierungsstufen, Reinigung biologischer Substanzen u.a.m.) entscheidende Vorteile gegenüber polyklonalen Antiseren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen Bestandteile von FVIII-Präparaten hergestellt. Anti-FVIII:vWf Antikörper wurden für die Reinigung von FVIII:C aus humanem Plasma eingesetzt.

4.1 Isolierung des FVIII-Komplexes aus kommerziellen FVIII-Präparaten

Zunächst wurde die Zusammensetzung drei verschiedener FVIII:vWf-Präparate in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und in der Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Durch die Immobilisierung der aufgetrennten Proteine und anschließender Immunfärbung mit polyklonalen Antiseren konnten mehrere Plasmaproteine zugeordnet werden. Alle Präparate zeigten starke Verunreinigungen mit Fibrinogen, Fibronectin und humanem Serumalbumin. Für die Untereinheiten des FVIII:vWf wurde ein Molekulargewicht von 240 000 D bestimmt. Fibronectin und FVIII:vWf zeigten in beiden Gelelektrophoresen ein identisches Laufverhalten und konnten somit nicht voneinander getrennt werden.

Bei der Herstellung der monoklonalen Antikörper sollte eine möglichst reine FVIII-Präparation eingesetzt werden, um die Ausbeute an FVIII-spezifischen monoklonalen Antikörpern zu erhöhen. Daher wurde die Reinigung des FVIII-Komplexes angestrebt.

Proteinfällungen werden häufig als erste Anreicherungsschritte bei einer Proteinaufreinigung eingesetzt. Eine 2-5fache Anreicherung des FVIII-Komplexes wurde durch Fällungen mit PEG 6000 aus Schweine- und Rinderplasma erzielt (Knutson und Fass 1982, Schmer et al. 1972).
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proteinfällungen mit PEG 6000 und Brij 35 erwiesen sich für die Anreicherung von FVIII aus kommerziellen FVIII-Präparaten als ungeeignet, da bei allen Ansätzen starke Aktivitätsverluste auftraten und keine Abtrennung der kontaminierenden Proteine erzielt wurde. Für die Anreicherung von FVIII aus humanem Plasma scheint die Proteinfällung mit PEG 6000 und anderen Polymeren erfolgversprechender zu sein. Farrugia et al. (1984) berichten über verschiedene Polymere (u.a. PEG 6000), die den FVIII-Komplex präzipitieren, während der größte Teil an Fibrinogen in Lösung bleibt. Wurde jedoch anstelle von Plasma FVIII-Konzentrat für die Fällungen eingesetzt, so konnte parallel zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, keine Anreicherung erzielt werden.

Neben Proteinfällungen wurden mehrere Säulenmaterialien auf ihre Eignung zur Reinigung von FVIII aus kommerziellen FVIII-Präparaten getestet.
Zu Beginn der Arbeit wurden mehrere FVIII-Präparate verschiedener Hersteller parallel getestet. Nachdem sich in den ersten Versuchen herausstellte, daß mit dem Präparat Actif VIII (Rhone Puolenc) höhere Ausbeuten erzielt werden konnten, wurde nur mit diesem Präparat weitergearbeitet.

Aufgrund seines hohen Molekulargewichts kann der FVIII-Komplexes mit Hilfe der Gelfiltration weitgehend von kontaminierenden Proteinen abgetrennt werden. Da die Literaturangaben über das Molekulargewicht des FVIII (1-20 Mio D) stark varieren, wurden mehrere Säulenmaterialien mit unterschiedlichen Ausschlußgrenzen verwendet.

Die besten Ergebnisse wurden durch Chromatographie an Sepharose CL 6B mit Citratpuffer als Elutionsmittel erzielt. Die Hauptaktivität eluierte im Ausschlußvolumen der Säule. Zur Anreicherung größerer Mengen wurde dieses Verfahren im präparativen Maßstab weitergeführt. Hier konnte bei einer Ausbeute von 95 % eine über 100fache Anreicherung erzielt werden. Bezogen auf die spezifische Aktivität von FVIII im Plasma (0,014 E/mg) ist die Präparation 4000fach angereichert.Die spezifische Aktivität lag mit ca. 55 E/mg etwas höher als die in der Literatur beschriebenen Werte für die Reinigung des FVIII-Komplexes. Durch Chromatographie an Biogel A 15m erzielten Fay et al. (1982) eine 34fache Anreicherung gegenüber kommerziellem FVIII-Präparat. Die von Thorell und Blombeck durch Cryopäzipitation, Proteinfällung und anschließender Chromatographie an Sephacryl S-1000 aus Plasma angereicherte FVIII-Präparation wies eine spezifische Aktivität von 47 E/mg auf. Eine 500fache Anreicherung gegenüber Cryopräzipitat konnten Legaz et al. (1972) durch $Al(OH)_3$-Adsorption, Chromatographie an Tricalcium-citrat-Cellulose, Präzipitation mit Concanavalin A und anschließender Chromatographie an Agarose 15m erzielen (34 E/mg, 22 % Ausbeute).

Die durch Gelfiltration an Sephrose CL 6B angereicherte FVIII-Präparation konnte durch Thrombin 3fach aktiviert werden. FVIII:vWf wurde durch Raketenimmunelektrophorese nachgewiesen. Zur Ermittlung der Reinheit wurde die Präparation in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Wurde das Gel mit Coomassie-Lösung angefärbt, so war nur eine Bande zu erkennen, die dem Molekulargewicht der FVIII:vWf Untereinheiten entsprach. Die wesentlich empfindlichere Silberfärbung machte weitere Banden sichtbar. Es wurden geringe Verunreinigungen durch Fibrinogen festgestellt. Die Fibrinogen- und die Fibronectinkonzentration lag in dieser Präparation unter 2 µg/ml, da beide Proteine mit Hilfe der Raketenimmunelektrophorese (Empfindlichkeit 0,5-2 µg) nicht nachgewiesen werden konnten.
Da eine vollständige Abtrennung der noch vorhandenen Kontaminationen durch den Einsatz mehrerer Ionenaustauschermaterialien nicht erreicht werden konnte, diente diese Präparation als Immunogen zur Herstellung der monoklonalen Antikörper.
Das oben beschriebene Trennverfahren zur Isolierung des FVIII-Komplexes wurde mehrmals wiederholt. Dabei wurden starke Schwankungen in der spezifischen Aktivität der FVIII-Präparate festgestellt. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen gemacht. Miyashita und Mitarbeiter (1984), die ingesamt 50 FVIII-Päparate von 12 verschiedenen Herstellern über einen Zeitraum von einem Jahr untersuchten, stellten starke Schwankungen in der Proteinzusammensetzung, FVIII-Stabilität und Löslichkeit der einzelnen FVIII-Präparate fest.

4.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Für die Herstellung monoklonaler anti-FVIII:vWf Antikörper wurden acht Fusionen mit drei verschiedenen Myelomzellinien durchgeführt. Die höchste Fusionsrate wurde mit der Myelomzellinie NSI erzielt.Bei NSI Fusionen konnten durchschnittlich 200, bei den Ag8 Fusionen ca. 100 und bei der NSO Fusion 16 Mikrotiterlöcher mit mehreren anwachenden Klonen detektiert werden.

Da für die Immunisierung kein reines Antigen zur Verfügung stand, waren neben anti-FVIII:vWf Antikörper auch Antikörper zu erwarten, die gegen andere Bestandteile des FVIII-Präparats gerichtet sind. Da ein ELISA mit der angereicherten FVIII-Präparation zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte, mußte zunächst ein Testsystem etabliert werden mit dem spezifisch anti-FVIII:vWf Antikörper detektiert werden. Dieser Test sollte es ermöglichen in relativ kurzer Zeit eine große Anzahl Kulturüberstände zu testen. Da in der Abteilung Cytogenetik Endothelialzellen routinemäßig kultiviert wurden, lag es nahe, diese FVIII:vWf synthetisierenden Zellen für den Test einzusetzen. Die für anti-FVIII:vWf typische Immunfärbung von Endothelialzellen ermöglichte eine schnelle und sichere Detektion positiver Hybridklone.
Zur Vorselektion wurde ein ELISA zum Nachweis von Mausimmunglobulinen eingesetzt. Er diente dazu Antikörperproduzierende von nicht produzierenden Klonen zu unterscheiden und die Zahl der zu testenden Überstände einzugrenzen. Anti-Fibrinogen und anti-Fibronectin Antikörper wurden mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

Um ein Überwachsen durch nicht produzierende Zellen zu verhindern, sollten Klonierungen möglichst bald nach der Fusion durchgeführt werden. Einige Hybridomakulturen, vor allem die aus der Fusion mit Ag8-Myelomzellen entstandenen Hybridome bereiteten bei der Subklonierung enorme Schwierigkeiten. Obwohl in einer großen Anzahl von Experimenten verschiedene Klonierungstechniken und mehrere Wachstumsfaktoren eingesetzt wurden, konnte der Verlust einiger positiver Hybridome nicht verhindert werden. Letztlich konnten 14 monoklonale Hybridzellinien etabliert werden, die Antikörper gegen FVIII:vWf (9), Fibrinogen (2), Fibronectin (1) und andere Bestandteile des FVIII-Präparats (2) produzieren. Diese ließen sich den Ig-Klassen IgG_1 (10), IgG_{2a} (1), IgG_3 (2) und IgM (1) zuordnen.

Die Hybridomzellinien zeichnen sich durch relativ gutes Wachstum und hohe Antikörperproduktion (50-200 µg/ml in 5 Tagen) aus. Die Antigenspezifität der anti-Faktor VIII:vWf Antikörper wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie und durch Immunfällung mit ^{125}J-markiertem FVIII bestimmt. Durch die Immunfällung konnte gezeigt werden, daß die Antikörper spezifisch mit FVIII reagieren. Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie reagieren diese Antikörper nur mit Zellen, die FVIII:vWf einlagern (Endothelialzellen, Thrombozyten). Sie zeigten keine Kreuzreaktion mit AKR-, Swiss 3T3-, Balb/c- und FS4-Fibroblasten und waren im ELISA mit Fibrinogen bzw. Fibronectin negativ.
Im Immunoblot binden die Antikörper zwar an nativen, aber nicht an denaturierten und reduzierten FVIII:vWf. Dies könnte ein Hinweis auf Konformationsdeterminanten sein. Solche antigenen Determinanten hängen von der nativen, räumlichen Konformation ab und sind dadurch charakterisiert, daß in ihnen Aminosäuren in einer topographischen Einheit vorliegen, die in der Primärsequenz weit auseinanderliegen. Auf der anderen Seite könnten die Antikörper auch von Disulfidbrücken abhängige Epitope erkennen. Um die von den Antikörpern erkannten Regionen genau zu definieren sind allerdings eine Reihe von Bindungsstudien, u.a. mit denaturiertem, nicht reduziertem FVIII:vWf notwendig.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, spielt der FVIII:vWf eine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenadhäsion und bei der Thrombozytenaggregation. Faktor VIII:vWf dient als Mediator der Plättchenadhäsion, indem er sowohl an das Glykoprotein Ib, als auch an das freigelegte Kollagen des Subendothels bindet (Furlan 1986). In Anwesenheit des Antibiotikums Ristocetin bindet FVIII:vWf an das Glycoprotein Ib der Thrombozytenmembranen und löst somit die Plättchenaggregation aus (Senogles und Nelsestuen 1983).

Um den Einfluß der monoklonalen FVIII:vWf-Antikörper auf die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität zu testen, wurden Thrombozytensuspensionen vor der Induktion der Aggregation durch Ristocetin mit den Antikörpern inkubiert. Eine Hemmung der Aggregation konnte nur bei polyklonalem Antiserum festgestellt werden. Monoklonale Antikörper zeigten bei den im Test eingesetzten Mengen (bis 800 µg) keine Hemmung und scheinen nicht gegen die für die Bindung an Glykoprotein Ib verantwortlichen Strukturen des FVIII:vWf gerichtet zu sein oder solche Strukturen durch ihre Bindung an FVIII:vWf zu beeinflussen.

Neben Hybridzellen, die Antikörper gegen FVIII:vWf, Fibrinogen und Fibronectin produzieren, wurden zwei Hybridklone isoliert, die monoklonale Antikörper gegen bis jetzt noch nicht identifizierte Antigene bilden. Diese Klone sezernieren Antikörper, die bei der Immunfluoreszenzmikroskopie auf Endothelialzellen den Zellkern bzw. die Chromosomen anfärben. Der Antikörper 76/47 reagiert ebenfalls mit humanen Fibroblasten (FS4) und Mausfibroblasten (Swiss 3T3, Balb/c, AKR 431). Der Antikörper 62/01 zeigt eine positive Reaktion mit humanen Fibroblasten und Zellen der Fibrosarkomzellinie HA 1781, während AKR 431-, U2OS- (Osteosarkom) und T 24- (Blasenkarzinom)- Zellen nicht markiert werden.
Zunächst wurde angenommen, daß der Antikörper 76/47 gegen ein konservatives nukleäres Protein, z.B. gegen ein Histon gerichtet sein könnte.
Dieser Antikörper zeigt im Immunoblot mit Histonen allerdings keine spezifische Reaktion. Beim ELISA, bei der Immunfällung und beim Immunblot mit FVIII-Konzentraten waren beide Antikörper negativ. Mögliche Ursachen dafür könnten sein: a) die Antigene sind in den später verwendeten FVIII-Konzentraten nicht mehr vorhanden, oder b) die Antigenkonzentration liegt unter der Nachweisgrenze der verwendeten Testmethoden.

Da die Antikörper an nukleäre Strukturen binden, muß die für die Immunisierung verwendete FVIII-Präparation Zellbestandteile enthalten haben, die möglicherweise bei der Blutentnahme durch beschädigtes Gewebe in das FVIII-Präparat gelangt sind und durch die Gelfiltration nicht abgetrennt wurden.
Von weiteren Versuchen zur Klärung der Antigenspezifität dieser Antikörper wurde aus Zeitgründen abgesehen. Weiterführende Experimente zur Identifizierung der beiden Antigene werden zur Zeit von Dr. Unteregger am Institut für Humangenetik der Universität Homburg durchgeführt.

Zur Herstellung der Immunaffinitätssäule wurde eine größere Menge anti-FVIII:vWf Antikörper benötigt. Die Antikörper wurden aus Fermentationsüberständen von Hybridzellen des Klons 126/38 gewonnen, da dieser sich problemlos an serumfreies Medium adaptieren ließ und sich durch gutes Wachstum und Antikörperproduktion auszeichnete. Die Anwendung von serumfreien Medium verringert die Fermentationskosten erheblich und bringt Vorteile bei der Reinigung der Antikörper.
Beim Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden erwies sich eine 50%ige Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Chromatographie an Protein-A-Sepharose für die Reinigung der Antikörper aus serumfreien Kulturüberständen am effektivsten. FCS-haltige Kulturüberstände sind für diese Affinitätsschromatographie ungeeignet, da das im Serum enthaltene Rinder-IgG ebenfalls an Protein A bindet. Rinder-IgG, das nach Beobachtungen von Peters et al. (1985) eine höhere Affinität zu Protein A hat, würde mit dem Maus-IgG um die Bindung an Protein A konkurrieren und somit die Bindungskapazität der gewünschten monoklonalen Antikörper herabsetzen.
Im Gegensatz zur Ionenaustauscherchromatographie konnte durch die Protein-A-Affinitätschromatographie eine homogene Antikörperpräparation mit einer Ausbeute von ca. 90 % erzielt werden.

4.3 Isolierung von FVIII:C aus humanem Plasma

Um ein für die Immunaffinitätschromatographie geeignetes Trägermaterial zu ermitteln, wurden die gereinigten Antikörper an unterschiedliche Säulenmaterialien gekoppelt. An CNBr-aktivierte Sepharose 2B konnten 72 % der eingesetzten Antikörper, an die drei Aminohexyl-substituierten Säulenmaterialien 95 % immobilisiert werden.
In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die an Sepharose 2B gekoppelten Antikörper, im Gegensatz zu den an AH-Säulenmaterialien gebundenen Antikörper, unverändert in der Lage waren, FVIII:vWf zu binden.
Das für die Chromatographie verwendete Plasma wurde durch Zentrifugation aus humanen Thrombozytenkonzentraten gewonnen.
Nach Adsorption des FVIII-Komplexes erfolgte eine Inkubation mit 255 mM $CaCl_2$, das sich in vorangegangenen Versuchen als geeignetes Mittel zur Spaltung des FVIII-Komplexes erwiesen hatte. Die Elution des FVIII:vWf durch 2 M $MgCl_2$ ermöglichte eine mehrmalige Verwendung der Antikörpersäule.
FVIII:C konnte mit Hilfe dieser Immunaffinitätschromatographie 22 000 fach angereichert werden. Mittels Immundiffusion konnte in der FVIII:C-Präparation kein Fibrinogen bzw. Fibronectin mehr nachgewiesen werden.
Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel zeigten sich drei schwach gefärbte Proteinbanden mit den Molekulargwichten von 180, 150 und 130 kD und eine stärker gefärbte 80 kD Bande (unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen). Die Präparation war jedoch nicht homogen und zeigte Verunreinigungen mit HSA und geringen Mengen an Fibrinogen.
Über das Molekulargewicht von FVIII:C finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben (siehe Tab.15).

M_r FVIII:C	reduziert	Referenz	
480 kD	+	Bolhuis et al.	1979
140 kD 48 kD	- +	Kang et al.	1980
85 kD	-	Cockburn et al.	1981
116 kD	+	Harris et al.	1981
100 kD	+	Fay et al. "	1982 1984
188, 122, 92 + 79/80 kD Bande	+/-	Fulcher et al. " "	1982 1983 1984
210, 170, 150, 90 + 79/80 zusätzlich 360 kD unter nicht red. Bed.	+	Rotblat et al.	1985
240, 160, 120, 92 + 77/80 kD	+/-	Truett et al.	1985
208, 178, 155, 145, 120, 113, 108, + 77/80 kD	+/-	Hamer et al.	1986
200, 180, 160, 150, 135, 130, 115, 105 + 80 kD Bande	+/-	Andersson et al.	1986

Tab. 15: Literaturangaben zum Molekulargewicht von FVIII:C
+/- identisches Bandenmuster vor und nach Reduktion

Nur wenige Autoren der FVIII:C-Reinigung berichten über eine FVIII:C Präparation, die unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel nur eine Bande aufweist. Die Mehrzahl der in jüngster Zeit erschienenen Berichte zeigen parallel zu dieser Arbeit die molekulare Heterogenität von FVIII:C Präparationen, die im SDS-Gel eine stärker gefärbte Bande mit M_r 80 000 (bzw. Doppelbande mit 77 und 80 kD) und eine Reihe weiterer Banden mit Molekulargewichten zwischen 90 und maximal 240 kD aufweisen (Fulcher et al. 1982, 1983 und 1984, Rotblat et al. 1985, Truett et al. 1985, Hamer et al. 1986, Andersson et al. 1986).

Der Nachweis, daß alle Proteinbanden vom FVIII:C Molekül abstammen, wurde in diesen Arbeiten mit Hilfe monoklonaler anti-Faktor VIII:C Antikörper (humaner FVIII:C Inhibitor, monoklonale Antikörper bzw. polyklonales Antiserum) erbracht. Durch Ermittlung der N-terminalen Aminosäuresequenz und durch Bindungstudien mit anti-FVIII:C Antikörper zeigten Andersson et al. (1986) und Rotblat et al. (1985), daß FVIII:C aus zwei Untereinheiten besteht, die durch Metallionen, möglicherweise Ca^{2+}-Ionen verbunden sind. Abbildung 40 zeigt die von Andersson et al. (1986) postulierte native Form des FVIII:C und die bei der Reinigung aus FVIII-Konzentrat isolierten und durch proteolytische Aktivität veränderten Formen. Die kleinste noch aktive Form von FVIII:C besteht aus einer 90 kD schweren aminoterminalen und einer 80 kD schweren carboxyterminalen Kette. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Polypeptide stellen die in der vorliegenden Arbeit isolierten Formen des FVIII:C dar.

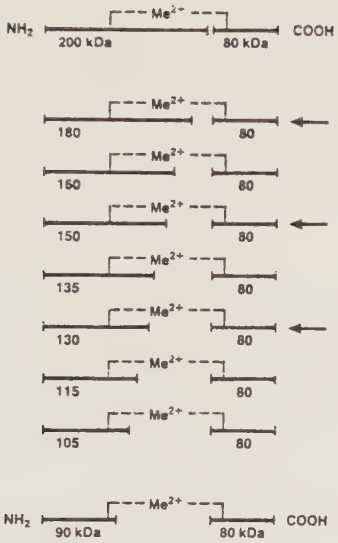


Abb. 40: Modell der nativen (280 kD) und fragmentierten aktiven Formen von FVIII:C
(nach Andersson et al. 1986)

Die Einwirkung von Plasma- und Thrombozyten-Proteasen bei der Herstellung von FVIII-Präparaten scheint der Grund für die Heterogenität der FVIII:C Präparationen zu sein (Fulcher und Zimmermann 1982). Um das Molekulargewicht des nativen FVIII:C im Plasma zu bestimmen, setzten Moake et al. (1983) und Weinstein und Chute (1984) ^{125}J-markierte humane FVIII:C Inhibitoren ein. Nach einer Inkubation der markierten Antikörper (Fab-Fragmente) mit frischem Plasma und Trennung der Proteine in einem SDS-Gel wurde ein Molekulargewicht von 260 bzw. 240 kD ermittelt.

Die im Laufe dieser Arbeit erschienenen Berichte mehrerer unabhängiger Arbeitsgruppen, denen die Klonierung und Expression von FVIII:C gelungen ist (Genentech: Vehar et al., Gitschier et al., Wood et al. 1984, Genetic Instituts: Toole et al. 1984, Chiron: Truett et al. 1985) liefern wichtige Erkenntnisse über die Primärstruktur des FVIII:C. Das aus der Nucleotidsequenz der cDNA ermittelte Precursor Protein besteht aus 2351 Aminosäuren mit einem relativen Molekulargewicht von 267 000 D.
Unter Berücksichtigung eines Kohlenhydratanteils (25 potentielle Glykosilierungsstellen) ergibt sich für die als Einzelstrang synthetisierte Vorstufe ein Molekulargewicht von mehr als 300 000 D. FVIII:C weist eine große Homologie zu Faktor V und Ceruloplasmin auf und kann in einzelne, sich teilweise wiederholende Domänen eingeteilt werden (A1-A2-B-A3-C1-C2).
Wood et al. (1984) zeigten, daß das durch Spaltung (carboxyterminal) aus dem 210 kD entstandene aminoterminale 90 kD Fragment die A1 und A2 Domäne, und die carboxyterminale 80 kD Untereinheit die A3, C1 und C2 Domäne umfasst. Die zentrale B Domäne scheint für die FVIII:C Aktivität in vitro nicht erforderlich zu sein (Toole et al. 1986, Burke et al. 1986). Durch Veränderung der FVIII:C cDNA und Co-Expression der aminoterminalen 90 kD Kette und der 80 kD Kette wurde die gleiche FVIII:C Aktivität gemessen, wie nach Expression der gesamten für FVIII:C codierenden Region. Die Bedeutung der B-Domäne (z.B. für die Anheftung an FVIII:vWf) konnte bislang nicht geklärt werden.

Die erfolgreiche Expression von FVIII:C in Säugetierzellen eröffnet die Möglichkeit des Einsatzes von gentechnologisch hergestelltem FVIII:C bei der Therapie von Hämophilie A. Aus Erfahrungen, die bei anderen gentechnologisch hergestellten Produkten gemacht wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die Herstellung eines sicheren, klinisch getesteten Produkts ca. 7 bis 10 Jahre in Anspruch nimmt.

Neben der Suche nach effektiveren Vektoren bzw. Zellsystemen (die Aktivität des rekombinanten Proteins lag bei 1-7 % der normalen FVIII:C Konzentration im Plasma) müssen geeignete Massenzellkultur- und Reinigungsmethoden etabliert werden. Außerdem sind eine Reihe klinischer Tests erforderlich, um Fragen nach der in-vivo Effektivität und einer möglichen Immunogenität des gentechnologisch hergestellten FVIII:C zu klären.
Nach Angaben des Deutschen Instituts für medizinische Dokumentation und Information (DIMDI, Zeitrahmen der Literaturrecherche 1973-1987) ist bis heute keine Veröffentlichung über klinische Versuche mit rekombinantem FVIII:C erschienen. Nach Information von Dr. Gajewski (Fa. Bayer Leverkusen) werden zwei Patienten seit Beginn des 2. Quartals 1987 mit gentechnologisch hergestelltem FVIII:C (Genetic Instituts, Baxter Travenol) behandelt.

Da es bis heute fraglich ist, ob und in welchem Umfang rekombinanter FVIII:C bei der Therapie der Bluterkrankheit eingesetzt werden kann, ist die Etablierung einer geeigneten Methode zur Isolierung von FVIII:C aus Plasma von unverminderter Bedeutung.
Für das weltweit ausgebaute Netz der Blutbanken ist die Isolierung von FVIII und anderen Plasmaproteinen (u.a. HSA, Transferrin, Fibrinogen, Fibronectin) von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Aufarbeitung von FVIII aus Blut auch in den nächsten 20 Jahren weitergeführt wird.Die kommerzielle Methode der Plasma-Fraktionierung liefert jedoch relativ stark kontaminierte FVIII-Konzentrate.
Kürzlich gelang es Hamer et al. (1986) eine homogene FVIII:C-Präparation mit einer Aktivität von 8000 E/mg herzustellen. Nach Proteinfällungen mit Gelatine und PEG 6000 und anschließender Chromatographie an Biogel A 15m wurde der FVIII-Komplex an Dextran-Sulfat-Sepharose gebunden. Durch einen linearen $CaCl_2$-Gradienten konnten FVIII:C und FVIII:vWf getrennt eluiert werden. Zur Konzentrierung wurde die FPLC-Säule Mono S eingesetzt

und verbliebene Kontaminationen mit FVIII:vWf wurden durch eine anti-FVIII:vWf Säule entfernt. Obwohl eine Vielzahl von Proteinaseinhibitoren eingesetzt und auf Dialyseschritte verzichtet wurde, war die Ausbeute (12%) sehr gering.
Aufgrund des großen Material- und Zeitaufwandes und der geringen Ausbeute ist die von Hamer et al. (1986) beschriebene Methode für die großtechnische Herstellung von FVIII:C nicht geeignet.

Der Einsatz monoklonaler Antikörper bei der FVIII:C Reinigung bietet gegenüber kommerziellen Säulenmaterialien wesentliche Vorteile: a) Isolierung direkt aus Plasma; das Eluat kann dann zur Herstellung anderer pharmazeutisch wichtiger Substanzen weiterverwendet werden kann, b) schnelle Durchführbarkeit der Chromatographie bei geringem apparativem Aufwand, c) monoklonale Antikörper können in fast unlimitierter Menge mit immer gleichbleibender Qualität hergestellt werden.
Die Einführung dieser Methode bei der großtechnischen Plasmafraktionierung könnte zu relativ sauberen FVIII-Konzentraten und zur zunehmenden Standardisierung dieser Präparate führen.

4.4 Weiterführende Arbeiten

Erste Versuche mit dem monoklonalen anti-FVIII:vWf Antikörper 126/38 haben gezeigt, das die Immunaffinitätschromatographie bei der Reinigung von FVIII:C erfolgreich eingesetzt werden kann.
Eine Verbesserung der Versuchsergebnisse könnte möglicherweise a) durch den Einsatz eines anderen Antikörpers und b) durch Chromatographie mit frischem Plasma erzielt werden.
Da die Herstellung der monoklonalen Antikörper sehr zeitaufwendig war, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ein Antikörper für die FVIII:C Reinigung eingesetzt werden. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten aller

isolierten anti-FVIII:vWf Antikörper würde einen Hinweis auf ihre Eignung zur FVIII Reinigung geben. Die Ausweitung der in dieser Arbeit beschriebenen Immunaffinitätschromatographie auf präparativen Maßstab würde ausreichende Mengen an gereinigten FVIII:vWf liefern, der zur Bestimmung der Affinitätskonstanten notwendig ist. Für die Reinigung von FVIII:C sollten Antikörper mittlerer Affinität eingesetzt werden.

Außerdem sollte die Isolierung des gesamten FVIII-Komplexes mit Hilfe von schwach- oder mittelaffinen Antikörpern erprobt werden. Ein geeigneter Antikörper muß eine ausreichende Affinität besitzen, um den FVIII:vWf zu binden, aber auch eine genügend niedrige Affinität, um den Komplex unter milden dissoziierenden Bedingungen und möglichst geringem Aktivtätsverlust wieder freizugeben.
Ein solches Präparat könnte für die Therapie der Hämophilie A und der von-Willebrand-Jürgens Krankheit, die durch einen Mangel an aktivem FVIII:vWf und an FVIII:C gekennzeichnet ist, eingesetzt werden. Mögliche Kontaminationen durch Fibrinogen und Fibronectin könnten durch Affinitätschromatographie mit den isolierten anti-Fibrinogen und anti-Fibronectin Antikörpern beseitigt werden.
Die verminderte Aktivität des aus Thrombozytenkonzentrat gewonnenen Plasmas (50 % der Aktivität des Normalplasmas) deutet auf eine proteolytische Aktivität hin, die möglicherweise Proteasen aus beschädigten Thrombozyten zugeordnet werden kann. Bei der Herstellung der Konzentrate werden keine Proteaseinhibitoren verwendet. Weitere Versuche zur FVIII Reinigung sollten mit frischem Plasma durchgeführt werden.
Neben dem Einsatz für die Reinigung könnten die monoklonalen Antikörper für Epitop- und Strukturanalysen verwendet werden. Durch Bindungsstudien mit mehreren monoklonalen Antikörpern können Informationen über Orientierung des Antigens, Rezeptorbindungsstellen, Bindungsorte für Liganden u.a.m. erhalten werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Herstellung, Charakterisierung und Reinigung monoklonaler Antikörper, die gegen FVIII:vWf und andere Bestandteile von kommerziellen FVIII-Präparaten gerichtet sind, und ihrem Einsatz für die Reinigung von FVIII:C.

1) Gelelektrophoretische Untersuchungen zeigten, daß die zur Behandlung der Bluterkrankheit eingesetzten FVIII-Konzentrate starke Verunreinigungen mit anderen Plasmaproteinen aufweisen. Außerdem wurde eine starke Hersteller- und Chargen-abhängige Varianz in der Proteinzusammensetzung und der spezifischen Aktivität festgestellt.
Für die Anreicherung des FVIII-Komplexes aus kommerziellen FVIII-Konzentraten wurden mehrere Proteinaufarbeitungsmethoden (Proteinfällungen, Affinitäts- und Ionenaustauscherchromatographie, Gelfiltration) getestet und miteinander verglichen. Eine durch Gelfiltration an Sepharose CL 6B ca. 100fach angereicherter FVIII-Präparation (Ausbeute 95%) wurde als Immunogen für die Herstellung der monoklonalen Antikörper verwendet.

2) Für die Herstellung monoklonaler Antikörper wurden insgesamt acht Fusionen mit drei verschiedenen Myelomzellinien durchgeführt. Es konnten insgesamt 14 monoklonale Antikörper isoliert werden, die sich den Ig-Klassen IgG_1, IgG_{2a}, IgG_3 und IgM zuordnen ließen.

Die Antigenspezifität der monoklonalen anti-FVIII:vWf Antikörper wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit humanen Endothelialzellen und Thrombozyten und durch Immunpräzipitation mit ^{125}J-markiertem FVIII bestimmt.

Bei der Ristocetin-abhhängigen Thrombozytenaggregation bewirken die monoklonalen anti-FVIII:vWf Antikörper im Gegensatz zu polyklonalem Antiserum keine Hemmung.

Im Immunblot reagieren die monoklonalen Antikörper mit dem nativen Antigen, aber nicht mit den unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen aufgetrennten Untereinheiten der entsprechenden Proteine.

Neben den obengenannten Antikörpern konnten zwei weitere monoklonale Antikörper isoliert werden, die spezifisch gegen nukleäre Antigene gerichtet sind und in der Immunfluoreszensmikroskopie die Zellkerne bzw. Chromosomen unterschiedlicher Zellen anfärben.

3) Um ein für die Immunaffinitätschromatographie geeignetes Trägermaterial zu ermitteln, wurden die gereinigten Antikörper an unterschiedliche Säulenmaterialien gebunden. Die durch CNBr aktivierte Sepharose 2B erwies sich für die Isolierung von FVIII:C aus humanem Plasma am geeignetsten.
Nach Adsorption des FVIII-Komplexes an die Antikörpersäule konnte FVIII:C durch 255 mM $CaCl_2$ eluiert und somit in einem Schritt ca. 22 000fach angereichert werden. Die Elution des FVIII:vWf durch 2 M $MgCl_2$ ermöglichte eine mehrmalige Verwendung der Antikörpersäule.
Die Immunaffinitätschromatographie mit anti-FVIII:vWf Antikörpern stellt eine geeignete Methode für die Herstellung relativ sauberer und standardisierter FVIII-Präparate dar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aebersold, R.H., Teplow, D.B., Hood, L.E., Kent, S.B.H. (1986)
Elektroblotting onto activated glass:high effeciency preparation of proteins from analytical SDS-Polyacrylamide gels for direkt sequence analysis
J. Biol. Chem. 261 (9), 4229-4238

Aihaira, M., Cooper, H.A., Wagner, R.H. (1984)
Platelet-collagen interactions: Increase in rate of adhesion of fixed washed platelets by factor VIII-related antigen
Blood 63 (3), 495-501

Andersson, L.-O., Forsman, N., Huang, K., Larsen, K., Lundin, A., Pavlu, B., Sandberg, H., Sewerin, K., Smart, J. (1986)
Isolation and characterisation of human factor VIII: Molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2979-2983

Austen, D.E.G. (1979)
The chromatographic separation of factor VIII on aminohexyl-sepharose
Br. J. Haematol. 43, 669-674

Austen, D.E.G., Rhymes, I.R., Rizza, C.R. (1981)
Factor VIII concentrates: what the label says
Lancet 2, 1167

Bolhuis, P.A., Beeser-Visser, N.H., Sixma, J.J. (1979)
Molecular weight of human plasma factor VIII
Thrombosis Research 16, 497-506

Booth, W.J., Furby, F.H., Berndt, M.C. Castaldi, P.A. (1984)
Factor VIII/von Willebrand factor has potent lectin activity
Biochem. Biophys. Res. Comm. 118 (2), 495-501

Born, G.V.R. (1962)
Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets
J. Physiol. 162, 67

Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Analyt. Biochem. 72, 248-254

Breddin, K., Grun, H., Krzywanek, H.J., Schremmer W.P. (1975)
Zur Messung der spontanen Thrombozytenaggregation. Plättchenaggregationstest III. Methodik
Klin. Wschr. 53, 81

Burke, R.L., Pachl, C., Quiroga, M., Rosenberg, S., Haigwood, N., Nordfang, O., Ezban, M. (1986)
The functional domains of coagulation factor VIII:C
J. Biol. Chem. 261 (27), 12574-12578

Campbell, A.M. (1984)
in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biologie, Vol.13: Monoclonal Antibody Technologie, (Ed. Burdon R.H., van Knippenberg P.H.)
Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford

Chediak, J., Chausow, A., Solarski, A., Telfer, M.C., (1984)
Pulmonary function in hemophiliac patients treated with commercial factor VIII concentrates
Am. J. Med. 77, 293-296

Chopek, M.W., Girma, J.-P., Fujikawa, K., Davie, E.W., Titani, K. (1986)
Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits
Biochemistry 25, 3146-3155

Cockburn, C.G., de Beaufre-Apps, R.J., Wilson, J., Hardisty, R.M. (1981)
Parallel destruction of factor VIII procoagulant activity and an 85000 dalton protein in highly purified factor VIII/vWf
Thrombosis Research 21, 295-309

Counts, R.B., Paskell, S.L., Elgee, S.K. (1978)
Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/von Willebrand factor
J. Clin. Invest. 62, 702-709

Cramer, E.M., Vainchenker, W., Vinci, G., Guichard, J., Breton-Gorius J. (1985)
Gray platelet syndrome: immunoelectron mikroskopic localization of fibrinogen and von Willebrand factor in platelets and megacaryocytes
Blood 66 (6), 1309-1316

Delvos, U., Müller-Berghaus, G. (1985)
Die Regulation der Blutgerinnung
Naturwissenschaften 72, 461-469

Doods, W.J. (1969)
Hepatitic influence on splenic synthesis and release of coagulation activities
Science 166, 882-883

Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R. (1978)
Isolation of pure IgG_1, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein-A-sepharose
Immunochemistry 15, 429-436

Farrugia, A., Griffin, B., Pepper, D., Prowse, C. (1984)
Studies on the procurement of coagulation factor VIII: selective precipitation of factor VIII with hydrophilic polymers
Thromb. Haemostas. 51 (3), 338-342

Fay, P.J., Chavin, S.I., Schroeder, D., Young, F.E., Marder, V.J. (1982)
Purification and characterization of highly purified human factor VIII consisting of a single type of polypeptide chain
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7200-7204

Fay, P.J., Chavin, S.I., Malone, J.E., Schroeder, D., Young, F.E., Marder, V.J. (1984)
The effect of carbohydrate depletion on procoagulant activity and in vivo survival of highly purified human factor VIII
Biochim. Biophys. Acta 800, 152-158

Freund, J., McDermont, K. (1942)
Sensitisation to horse serum by means of adjuvants
Proc. Soc. exp. Biol. 49, 548

Fulcher, C.A., Zimmermann, T.S. (1982)
Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1648-1652

Fulcher, C.A., Roberts, J.R., Zimmermann, T.S. (1983)
Thrombin proteolysis of purified factor VIII procoagulant protein: correlation of activation with generation of a specific polypeptide
Blood 61 (4), 807-811

Fulcher, C.A., Gardiner, E., Griffin, J.H., Zimmermann, T.S. (1984)
Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated protein C and its analogy with factor V
Blood 63 (2), 486-498

Furlan, M. (1986)
Factor VIII/von Willebrand factor: a multivalent ligand binding to platelets and collagen
Blut 52, 329-336

Galfre, G., Milstein, C. (1981)
Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures
Meth. Enzymol. 73, 3-46

Gefter, M.L., Margulies, D.H., Scharff, M.D. (1977)
Simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells
Somatic Cell Genet. 3, 231-235

Gerstoft, J., Bentsen, K., Scheibel, E., Dalsgard-Nielsen, J., Gormsen, J., Dickmeiss, E. (1984)
Alterations in T-lymphocyte subsets among Danish haemophiliacs: Relation to source of factor VIII preparations and high dose factor VIII treatment
Scand. J. Haematol. 32, 544-551

Ginsburg, D., Handin, R.I., Bonthron, D.T., Donlon, T.A., Bruns, G.A.P., Latt, S.A., Orkin, S.H. (1985)
Human von Willebrand factor (vWf): Isolation on complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization
Science 228, 1401-1406

Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J., Lawn, R.M. (1984)
Characterization of the human factor VIII gene
Nature 312, 326-330

Goding, J.W. (1980)
Antibody production by hybridomas
J. Immunol. Meth. 39, 285-308

Ham, R.G. (1965)
Clonal growth of mammalian cells in a chemical defined, synthetic medium
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 288-293

Hamer, R.J., Koedam, J.A., Beeser-Visser, N.H., Sixma, J.J. (1986)
Human factor VIII: purification from commercial factor VIII concentrate, characterization, identification and radiolabeling
Biochim. Biophys. Acta 873, 356-366

Hämmerling, G.J., Hämmerling, U., Kearney, J.F. (1981)
Monoclonal antibodies and T-cell hybridomas
Research Monographs in Immunology 3

Hancock, K., Tsang, V.C.W. (1983)
India ink staining of proteins on nitrocellulose paper
Analy. Biochem. 133, 157-162

Handa, M., Titani, K., Holland, L.Z., Roberts, J.R., Ruggeri, Z.M. (1986)
The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib
J. Biol. Chem. 261 (27), 12579-12585

Harris, R.B., Newman, J., Johnson, A.J. (1981)a
Patial purification of biologically active, low molecular weight, human antihemophilic factor free of von Willebrand factor
I. Parial characterization and evidence for disulfide bond(s) suspectible to limited reduction
Biochim. Biophys. Acta 668, 456-470

Harris, R.B., Newman, J., Johnson, A.J. (1981)b
Patial purification of biologically active, low molecular weight, human antihemophilic factor free of von Willebrand factor
II. Further purification with thiol-disulfide interchange chromatographie and additional evidence for disulfide bonds suspectible to limited reduction
Biochim. Biophys. Acta 668, 471-480

Hilfenhaus, J., Weidmann, E. (1986)
Pateurization as an efficient method to inactivate blood borne viruses in factor VIII concentrates
Arzneim.-Forsch./ Drug Res. 36 (1), Nr.4, 621-625

Hoppe, J. (1976)
cAMP-abhängige Proteinkinade aus Kaninchenskelletmuskel
Dissertation an der TU Braunschweig

Howard, M.A., Firkin, B.G. (1971)
Ristocetin- a new tool in the investigation of platelet aggregation
Throm. Diath. Haemorrh. 26, 362-369

Hoyer, L.W. (1981)
The factor VIII complex: Structure and function
Blood 58, 1-13

Hultin, M.B., Nemerson, Y. (1978)
Activation of factor X by factor IXa and VIII; a specific assay for factor IXa in presence of thrombin-activated factor VIII
Blood 52 (5), 928-940

Hultin, M.B. (1982)
Role of human factor VIII in factor X activation
J. Clin. Invest. 69, 950-958

Hynes, R.O. (1986)
Fibronectine
Spektrum der Wissenschaft (August), 80-91

Iscove, N.N., Melchers, F. (1978)
Complete replacement of serum albumin, transferrin and soyabean lipid in cultures of lipopolysaccaride-reactive B lymphocytes
J. Exp. Med. 147, 923

Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., Nachman, R.L. (1973)
Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells
J. Clin. Invest. 52, 2757-2764

Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., Nachman, R.L. (1974)
Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1906

Jäger, V. (1984)
Wachstumsbedürfnisse der Maus-Myelomzellinie X63 Ag8.653 und von ihr abgeleiteter Hybridoma-zellinien
Diplomarbeit an der TU Braunschweig

Johnson, A.J., Mathews, R.W., Fulton, A.J. (1984)
Fractionation of factor VIII and factor IX
Scand. J. Haematol. 21, 1-20

Jonak, Z.L. (1980)
Isolation of monoclonal antibody from supernatant by ammonsulphate precipitation
in: Monoclonal Antibody, Plenum Press, 405-406

Kang, E.P., Cruickshank, W.H., Rock, G. (1980)
Visualization of low molecular weight factor VIII purified in the presence of benzamidine
Thrombosis Resaerch 17, 337-346

Kearney, L.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky,K. (1979)
A new mouse myeloma cell line that has lost immuno-globulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines
J. Immunol. 123, 1548-1550

Kessler, C.M., Floyd, C.M., Rick, M.E., Krizek, D.M., Lee, S.L., Gralnick, H.R. (1984)
Collagen-factor VIII/von Willebrand factor protein interaction
Blood 63 (6), 1291-1298

Knutson, G.J., Fass, D.N. (1982)
Porcine factor VIII:C prepared by affinity interaction with von Willebrand factor and heterologous antibodies: sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel analysis
Blood 59 (3), 615-624

Köhler, G., Milstein, C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifity
Nature 256, 495-497

Köhler, G., Milstein, C. (1975)
Derivation of specific antibody producing tissue culture tumor lines by cell fusion
Eur. J. Immunol.6, 511-519

Kröninger, A., Kumpe, A., Wormsbächer, W., Herchenhahn, B. (1982)
Faktor-VIII-Konzentrate
Med. Welt 33 (28), 1027-1033

Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the essembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685

Laurell, C.B. (1966)
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarosegel containing antibodies
Anal. Biochem. 15, 45

Legaz, M.E., Schmer, G., Counts, R.B., Davie, E.W. (1973)
Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor)
J. Biol. Chem. 248 (11), 3946-3955

Levine, J.D., Harlan, J.M., Harker, L.A., Joseph, M.L. Counts, R.B. (1982)
Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture
Blood 60, 531-533

Little, D., Said, J.W., Siegel, R.J., Fealy, M., Fishbein, M.C. (1986)
Endothelial cell markers in vascular neoplasms: an immunohistochemical study comparing factor VIII-related antigen, blood group specific antigens, 6-keto-PGF1 alpha, and Ulex europaeus 1 lectin
J. Pathol. 149, 89-95

Littlefield, J.W. (1964)
Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants
Science 145, 709-710

Loesberg, C., Gonsalves, M.D., Zandbergen, J., Willems, C., Van Aken, W.G., Stel, H.V., Van Mourik, J.A., DeGroot, P.G. (1983)
The effect of calcium on the secretion of factor VIII-related antigen by cultured human endothelial cells
Biochim. Biophys. Acta 763, 160-168

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremanns (1965)
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion
Immunochemistry 2, 235

Marder, V.J., Mannucci, P.M., Firkin, B.G., Hoyer, L.W., Meyer, D. (1985)
Standard nomenclature for factor VIII and von Willebrand factor: A recommendation by the international committee on thrombosis and haemostasis
Thrombosis and Haemostasis 54 (4), 871-872

Margolis, J., Li, Z.P. (1986)
Heat sterilisation to inactive AIDS virus in lyophilised factor VIII
Aust. NZ J. Med. 16 (3), 413

Matsuda, H., Sugiura, S. (1970)
Ultrastructure of "tubular body" in endothelial cells of the ocular blood vessels
Invest. Ophthamol. 9, 919-925

McArthur, M.M., MacGregor, I.R., Prowse, C.V., Hunter, N.R., Dawes, J., Pepper, D.S. (1986)
The use of human endothelial cells cultured in flat wells and on microcarrier beads to assess tissue plasminogen activator and factor VIII related antigen release
Thrombosis Resaerch 41, 581-587

McCarrol, D.R., Ruggeri, Z.M., Montgomery, R.R. (1984)
The effect of DDAVP on plasma levels of von Willebrand antigen II in normal individuals and patiens with von Willebrand's disease
Blood 63 (3), 532-535

Mertens, K., van Wijngaarden, A., Bertina, R.M. (1985)
The functional defect of factor VIII Leiden, a genetic varient of coagulation factor VIII
Thrombosis and Haemostasis 54 (3), 654-660

Miyashita, C., Hellstern, P., Köhler, M., von Blohn, G. Wenzel, E. (1984)
In vitro characterisation of commercial factor VIII concentrates: long-term follow-up
Blut 49, 53-59

Moake, J.L., Weinstein, M.J., Troll, J.H., Chute, L.E., Colannino, N.M. (1983)
Direct radioimmune detection in human plasma of the association between factor VIII procoagulant protein and von Willebrand factor, and the interaction of von Willebrand-bound procoagulant VIII with platelets
Blood 61 (6), 1163-1173

Moore, G.E., Gerner, R.E., Franklin, H.A. (1967)
Culture of normal human leucocytes.
J. Am. Medical Asso. 199, 519-524

Morfini, M., Longo, G., Matucci, M., Vannini, S., Messori, A., Filimberti, E., Duminuco, M., Avanzi, G., Rossi-Ferrini, P. (1984)
Cryoprecipitate and factor VIII commercial concentrates: in vitro characteristics and in vivo compartmental analysis
La Ricerca Clin. Lab. 14, 681-691

Morton, H.J. (1970)
A survey of commercially available tissue culture media
In Vitro 6, 89-108

Newman, J., Johnson, A.J., Karpatkin, M.H., Puszkin, S. (1971)
Methods for production of clinically effective intermediate-purity factor VIII concentrates
Br. J. Haematol. 21, 1-20

Ng, P.K., Eguizabal, H.C., Mitra, G. (1986)
Preparation of high purity factor VIII concentrates
Thrombosis Research 42, 825-834

Oakley, R. (1980)
A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels
Analyt. Biochem. 105, 361-363

Ouchterlony, Ö. (1949)
Antigen-antibody reactions in gels
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 25, 507-515

Owen, W.G., Wagner, R.H. (1972)
Antihemophilic factor: Seperation of an active fragment following dissoziation by salts or detergents
Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 502-515

Peters, J.H., Baumgarten, H., Schulze, M. (1985)
Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlag
Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo

Pintus, C., Ransome, J.H., Evans, C.H. (1983)
Endothelial cell growth supplement: a cell cloning factor that promotes the growth of monoclonal antibody producing hybridoma cells
J. Immunol. Meth. 61, 195-200

Piovella, F., Nalli, G., Malamani, G.D., Majolini, I., Frassoni, F., Sitar, G.M., Ruggeri, A., Dell'Orbo, G., Ascari, E. (1978)
The ultrastructural localization of factor VIII antigen in human platelets, megakaryocytes and endothelial cells utilizating a ferritin-labelled antibody
Br. J. Haematol., 39, 209-213

Ragni, M.V., Tegtmeier, G.E., Levy, J.A., Kaminsky, L.S., Lewis, J.H., Spero, J.A., Bontempo, F.A., Handwerk-Leber, C., Bayer, W.L., Zimmermann, D.H., Britz, J.A. (1986)
AIDS retrovirus antibodies in hemophiliacs treated with factor VIII or factor IX concentrates, cryo-precipitate, or fresh frozen plasma: prevalance, seroconversion rate, and clinical correlations
Blood 67 (3), 592-595

Reading, C.L. (1982)
Theory and methods for immunization in culture and monoclonal antibody production
J. Immunol. Meth. 53, 261-291

Reinders, J.H., De Groot, P.G., Gonzalves, M.D., Zandbergen, J., Loesberg, C., Van Mourik,J.A. (1984)
Isolation of a storage and secretory organelle containing von Willebrand protein from cultured human endothelial cells
Biochim. Biophys. Acta 804, 361-369

Rick, M.E., Hoyer, L.W. (1973)
Immunologic studies of antihemophilic factor: Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation
Blood 42, 737-747

Rizza, C.R. (1972)
in Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis (Ed. Briggs R.), Blackwell Scientific Publications, Oxford

Rock, G.A., Palmer, D.S., Tackaberry, E.S., Cruickshank, W.H. (1978)
The presence of high and low molecular weight forms of factor VIII in heparinized plasma
Tromb. Res. 13, 85

Rock, G.A., Cruickshank, W.H., Palmer, D.S. (1981)
Varient forms of procoagulant-like factor VIII in hemophiliacs
Thrombosis Research 21, 53-63

Rock, G.A., Tittley, P., Fuller, V. (1985)
An in vivo assessment of factor VIII concentrates
J. Am. Medical Asso. 254 (6), 777-780

Rotblat, F., O'Brien, D.P., O'Brien, F., Goodal, A.H., Tuddenham, E.G.D. (1985)
Purification of human FVIII:C and its characterization by western blotting using monoclonal antibodies
Biochemistry 24, 4294-4300

Ruggeri, Z.M., Zimmermann, T.S. (1980)
Varient von Willebrand's disease: Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets
J. Clin. Invest. 65, 1318-1325

Ruggeri, Z.M., Mannucci, P.M., Lombardi, R., Federici, A.B., Zimmermann, T.S. (1982) Multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor following administration of DDAVP: Implications for pathophysiology and therapy of von Willebrand's disease subtypes Blood 59. 1272-1278

Russo, C., Callegaro, L., Lanza, E., Ferrone, S. (1983) Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation J. Immunol. Meth. 65, 269-271

Sadler, J.E., Shelton-Inloes, B.B., Sorace, J.M., Harlan, J.M., Titani, K., Davie, E.W. (1985) Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6394-6398

Sakariassen, K.S., Ottenhof-Rovers, M., Sixma, J.J. (1984) Factor VIII-von Willebrand factor requires calcium for facilitation of platelet adherence Blood 63 (5), 996-1003

Santoro, S.A. (1983) Preferential binding of high molecular weight forms of von Willebrand factor to fibrillar collagen Biochim. Biophys. Acta 756, 123-126

Schmer, G., Kirby, E.P., Teller, D.C., Davie, E.W. (1972) The isolation and characterization of bovine factor VIII (antihemophilic factor) J. Biol. Chem. 247 (8), 2512-2521

Sengel, A., Stoebner, P. (1970)
Golgi origin of tubular inclusions in endothelial cells
J. Cell. Biol. 44, 223-226

Senogles, S.E., Nelsestuen, G.L. (1983)
Von Willebrand factor-a protein which binds at the cell surface interface between platelets
J. Biol. Chem. 258 (20), 12327-12333

Seppälä, I., Sarvas, H., Peterfy, F., Mäkelä, O. (1981)
The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using protein-A-sepharose
Scand. J. Immunol. 14, 335-342

Sie, P., Gillois, M., Boneu, B., Chap, H., Bierme, R., Douste-Blazy, L. (1980)
Reconstitution of liposomes bearing platelet receptors for human von Willebrand factor
Biochem. Biophys. Res. Commun. 97 (1),133-138

Sixma, J.J., Sakariassen, K.S., Beeser-Visser, N.H., Ottenhof-Rovers, M., Bolhuis, P.A. (1984)
Adhesion of platelets to human artery subendothelium :Effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric composition
Blood 63 (1), 128-139

Slayter, H., Loscalzo, J., Bockenstedt, P., Handin, R.I. (1985)
Native conformation of human von Willebrand protein
J. Biol. Chem. 260 (14), 8559-8563

Sporn, L.A., Marder, V.J., Wagner, D.D. (1986)
Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers
Cell 46, 185-190

Stähli, C., Staehelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J., Häring, P. (1980)
High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis
J. Immunol. Meth. 32, 297-304

Stähli, C., Miggiano, V., Stocker, J., Takacs,B. (1983)
Distinction of epitopes by monoclonal antibodies
Methods in Enzymology 92, 242-253

Stel, H.V., van der Kwast, Th.H., Veerman,E.C.I. (1983)
Detection of factor VIII/coagulant antigen in human liver tissue
Nature 303, 530-532

Stel, H.V., Oudejans, C.B.M., Veerman, E.C.I., Meijer, C.J.L.M. (1985)
Immunological localization of factor VIII in placental endothelial cells
Br. J. Haematol. 63, 565-569

Thorell, L., Blombäck, M., Blombäck, B. (1983)
An in vivo study of a new factor VIII high purity preparation
Thromboses Research 31, 375-385

Thorell, L., Blombäck, B. (1984)
Purification of the factor VIII complex
Thrombosis Research 35, 431-450

Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Ashida, K., Walsh, K.A., Chopek, M.W., Sadler, J.E., Fujikawa, K. (1986)
Amino acid sequence of human von Willebrand factor
Biochemistry 25, 3171-3184

Toole, J.J., Knopf, J.L., Wozney, J.M., Sultzman, L.A., Buecker, J.L., Pittman, D.D, Kaufman, R.J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E.C., Amphlett, G.W., Foster, W.B., Coe, M.L., Knutson, G.J., Fass, D.N., Hewick, R.M. (1984)
Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor
Nature 312, 342-347

Toole, J.J., Pittman, D.D., Orr, E.C., Murtha, P., Wasley, L.C., Kaufman, R.J. (1986)
A large region (95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5939-5942

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354

Truett, M.A., Blacher, R., Burke, R.L., Caput, D., Chu, C., Dina, D., Hartog, K., Kuo, C.H., Masiarz, F.R., Merryweather, J.P., Najarian, R., Pachl, C., Potter, S.J., Puma, J., Quiroga, M., Rall, L.B., Randolph, A., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Dahl, H.H., Favalaro, J., Hansen, J., Nordfang, O., Ezban, M. (1985)
Characterization of polypeptide composition of human factor VIII:C and the nucleotide sequence and expression of the human kidney cDNA
DNA 4 (5), 333-349

Tuddenham, E.G.D., Lazarchick, J., Hoyer, L.W. (1981)
Structure and release of factor VIII by cultured human endothelial cells
Br. J. Haematol. 47, 617-626

Vehar, G.A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D.P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W.I., Harkins, R.N., Tuddenham, G.D. Lawn, R.M., Capon, D.J. (1984)
Structure of human factor VIII
Nature 312, 337-342

Wagner, D.D., Olmstedt, J.B., Marder, V.J. (1982)
Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells
J. Cell. Biol. 95, 355-360

Wallas, C.H., Strominger, J.L. (1963)
Ristocetins, inhibitors of cell wall synthesis in staphylococcus aureus
J. Biol. Chem. 238, 2264-2266

Warhal, M.J., Sweet, J.M. (1984)
The ultrastructural localization of von Willebrand factor in endothelial cells
Am. J. Pathol. 117 (2), 310-315

Weibel, E.R., Palade, G.E. (1964)
New cytoplasmic components in arterial endothelia
J. Cell Biol. 23, 101-112

Weinstein, M.J., Chute, L.E. (1984)
Two distinct forms of factor VIII coagulant protein in human plasma
J. Clin. Invest. 73, 307-316

Weiss, H.J., Hoyer, L.W. (1973)
Von Willebrand factor: Dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity
Science 182, 1149-1151

Weiss, H.J., Sussman, I.I., Hoyer, L.W. (1977)
Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor
J. Clin. Invest. 60, 390-404

Wion, K.L., Kelly, D., Summerfield, J.A., Tuddenham, E.G.D., Lawn, R.M. (1985)
Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues
Nature 317, 726-728

Wood, W.I., Capon, D.J., Simonsen, C.C., Eaton, D.L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P.H., Smith, D.H., Hollingshead, P., Wion, K., Delwart, E., Tuddenham, E.G.D, Vehar, G.A., Lawn, R.M. (1984)
Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones
Nature 312, 330-336

Zelechowska, M.G., van Mourik, J.A. Brodniewicz-Proba, T. (1985)
Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes
Nature 317, 729-732

Zimmermann, T.S., Ratnoff, O.D., Powell, A.E. (1971)
Immunologic differentiation of classic hemophilia (FVIII deficiency) and von Willebrand's disease
J. Clin. Invest. 50, 244-254

Zimmermann, T.S., Ruggeri, Z.M., Fulcher, C.A. (1983)
Factor VIII/von Willebrand factor
in: Progress in Haematology 13, 279-309,
E.B. Brown (ed), Grune and Stratton, New York

Zimmermann, T.S., Fulcher, C.A. (1985)
Factor VIII procoagulant protein
Clinics in Haematology 14 (2), 343-358

Die vorliegende Arbeit wurde in der Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH (GBF), in der Abteilung Cytogenetik unter der Leitung von Prof. Dr. H.U. Schairer angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Schairer für die zahlreichen Anregungen, für seine Hilfsbereitschaft sowie für das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit.
Bei Herrn Prof. R. Megnet möchte ich mich für sein Interesse an der Arbeit bedanken.
Herrn Dr. P. Friedl und Herrn Dr. D. Herbst möchte ich für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken.
Herrn Prof. J. Hoppe danke ich für die Einweisungen in die Techniken der HPLC und der Aminosäuresequenzierung.
Herrn Dr. R. Czapla danke ich für die Überlassung der humanen Endothelialzellen.
Herrn Dipl. Biol. V. Jäger (Abteilung Bioverfahrenstechnik) danke ich für die Durchführung der Fermentation.
Mein Dank gilt Fr. R. Lesch, Fr. U. Starosta und Fr. C. Bokelmann für ihre mit Rat und Tat geleistete Hilfe bei der Einarbeitung in die zellbiologischen Methoden.
Meinen Eltern, Bernd und Sabine möchte ich für ihre ideelle Unterstützung danken.

Der Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH danke ich für die finanzielle Unterstützung.

LEBENSLAUF

Name:	Thekla Burlager	
Geburtsdatum:	14.09.1958	
Geburtsort:	Esterwegen	
Eltern:	Heinrich Burlager	
	Elisabeth Burlager geb. Rave	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Schulbildung:	Volksschule Esterwegen	1965 - 1970
	Realschule Werlte	1970 - 1974
	Mariengymnasium Papenburg	1974 - 1977
Berufsausbildung:	Biologiestudium an der Universität Oldenburg	1977 - 1983
	Diplomarbeit an der GBF, Abt. Pflanzl. Zellkulturen	1982 - 1983
	Diplom-Hauptprüfung	Juni 1983
	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Cytogenetik der GBF mit dem Ziel der Promotion	1983 - 1986
	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Fa. Pharma Biotechnologie Hannover	ab Juli 1987

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil der Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Thekla Burlager
(Thekla Burlager)